

**EXPRESSION VON MHC- UND
DIFFERENZIERUNGSANTIGENEN
AUF ZELLEN DER SYNOVIALIS
UND DES PERIPHEREN BLUTES
BEI PATIENTEN MIT RHEUMATOIDER ARTHRITIS**

Christian Anton Ernst Schaller

Disbui. München

1988



Aus dem
Institut für Immunologie der Universität München
Vorstand:
Professor Dr. G. Riethmüller

EXPRESSION VON MHC - UND DIFFERENZIERUNGSANTIGENEN
AUF ZELLEN DER SYNOVIALIS UND DES PERIPHEREN BLUTES
BEI PATIENTEN MIT RHEUMATOIDER ARTHRITIS

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Christian Anton Ernst SCHALLER
aus
München

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatte:r: Professor Dr. G. Riethmüller

Mitberichterstatte:r: Prof.Dr. M. Schattenkirchner
 Prof.Dr.Dr. C. Hammer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. F.-W. Hagen

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Mai 1988

Meinen Eltern

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

BSG n.W.:	Blutsenkungsgeschwindigkeit nach Westergren
ELISA:	Enzym - gekoppelter - Immunsorbent - Test
FCS:	Fetales Kälberserum
HLA:	Human Leucocyte Antigen (menschliche Histo- kompatibilitätsantigene)
HS:	Humanserum
Ig:	Immunglobulin
IP:	Immun-Peroxidase
LMU:	Ludwig-Maximilians-Universität
MAK:	Monoklonaler Antikörper
MHC:	Major Histocompatibility Complex (majore Histo- kompatibilitäts-Antigene)
min:	Minuten
Mo/Mø:	Monozyten/Makrophagen
NK:	Natural Killer Cells
PBL:	Periphere Blutleukozyten
PBS:	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PHA:	Phytohämagglutinin
PWM:	Pokeweed Mitogen
RA:	Rheumatoide Arthritis
RF:	Rheumafaktor IgM - anti - IgG
SCE:	Single-Cell-ELISA
Subintima:	Subintimalschicht der Synovialis
SVE:	Synovektomie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Patienten, Materialien, Methoden	5
2.1	Patienten; Gewebe- und Blutproben	5
2.2.1	Präparation und Lagerung der Synovialisproben	5
2.2.2	Blutentnahme	6
2.3	Verwendete monoklonale Antikörper (MAK, 2.3.1 - 2.3.16).....	8
2.4	Methoden	15
2.4.1	Immunhistochemie: Immunperoxidase- Färbung (IP)	15
2.4.2	Single - Cell - ELISA	17
3.	Ergebnisse	19
3.1	Immunhistochemische Analyse infil- trierender Zellen der Synovialis	19
3.1.1	Morphologische Charakteristika	19
3.1.2	Ergebnisse mit den einzelnen monoklonalen Antikörpern	20
3.1.3	Expression von MHC - Klasse II - Antigenen im Synovialgewebe	36
3.2	Expression von Makrophagen-, Trans- ferrinrezeptor- und HLA-DR-Antigenen auf Synovialiszellen: quantitative Untersuchung	39
3.3	Gewebsspezifische Expression von MHC - Klasse II - Antigenen	49
3.3.1	Single - Cell - ELISA - Ergebnisse	49
3.3.2	Vergleich der Expression von MHC- Klasse II-Antigenen auf Blutleuko- zyten (PBL) und Synovialiszellen	52
4.	Diskussion der Ergebnisse	55
4.1	Immunhistologie der Synovialis	55
4.2	Single - Cell - ELISA	59
5.	Zusammenfassung	60
6.	Literaturverzeichnis	61

Expression von MHC- und Differenzierungsantigenen auf Zellen der Synovialis und des peripheren Blutes (PBL) bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA).

1. Einleitung

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung ungeklärter Ätiologie (36, LEMM et al., 1984). Sie wird als Folge abnormer immunologischer Reaktionen interpretiert. Diese Annahme wird durch die Erhöhung der Gammaglobuline im peripheren Blut, die Produktion von IgM-anti-IgG - Rheumafaktoren (RF) und die charakteristischen Infiltrate mononukleärer Zellen in der Synovialmembran unterstützt (19, DUKE et al., 1982). Als weiteres Indiz einer Immunopathogenese findet man im Blut von Patienten mit RA zirkulierende Immunkomplexe mit hohem Gehalt an IgG, IgM, Complement C3 und C4 (16, DEICHER et al., 1982) und eine erhöhte Zahl spontan in vivo aktivierter B-Lymphozyten (4, BELL und PINTO, 1984; 5, AL-BALAGHI et al., 1982).

Nach verschiedenen Berichten (22, FESSEL, 1975) liegt die Inzidenz der RA bei erwachsenen Kaukasiern zwischen 0.5 % und 4.0 %, wobei ein Verhältnis erkrankte Frauen : erkrankte Männer von 3 : 1 nicht ungewöhnlich ist (41, MASI und MEDSGER, 1979).

Rheumatoide Arthritiden sind zum Teil vergesellschaftet mit anderen Autoimmunerkrankungen wie Lupus Erythematoses, Sklerodermie, Dermatomyositis oder Psoriasis (42, MATHIES et al., 1982). Die Amerikanische Rheumatologenvereinigung (A.R.A.) unterscheidet mehr als 100 verschiedene Arten von Arthritis und Rheumatismus, die von der klassischen RA abzugrenzen sind (15, DECKER, 1983).

Neben den obengenannten Veränderungen im humoralen Immunsystem sind bei RA heute diverse Abweichungen der Zellulären Immunität bekannt. Wegen der weitaus stärkeren Anwesenheit von T-Lymphozyten als von B-Lymphozyten, sowohl in der rheumatoiden

Synovia, als auch im Synovialgewebe (24, FROLAND et al., 1982; 2, BANKHURST et al., 1976), wird dem zellulären Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Pathogenese chronisch-rheumatischer Entzündungen zugesprochen (34, KUROSAKA und ZIFF, 1983).

Vor allem durch den Einsatz monoklonaler Antikörper (MAK) konnten hier in den letzten Jahren neue Erkenntnisse gewonnen werden. So wurde bei RA eine erhöhte Anzahl aktivierter T-Helferzellen ($T4^+$) beschrieben, sowohl im peripher-venösen Blut (36, LEMM und WARNATZ, 1984), als auch in der Synovialis (19, DUKE et al., 1982; 32, KLARESKOG et al., 1982). Besonders in der Nähe synovialer Blutgefäße sind T-Helferzellen vermehrt lokalisiert (32, KLARESKOG, 1982). In der rheumatoiden Synovialmembran soll die Anzahl funktioneller T-Suppressorzellen ($T8^+$) vermindert sein (13, CHATTOPADHYAY et al., 1979), nicht jedoch in den reaktiven Zentren, den "transitional areas" (34, KUROSAKA und ZIFF, 1983).

Bei RA findet sich darüberhinaus ein großer Anteil HLA-DR-positiver Synovialzellen, speziell nahe der Gelenkhöhle (18, DREHER, 1983), die zumeist in engem Kontakt zu T-Helferzellen ($T4^+$) stehen.

In den reaktiven Zellen wurden auch enge Kontakte von makrophagenähnlichen Zellen und Suppressor/Zytotoxischen T-Lymphozyten beschrieben. Diese morphologischen Befunde weisen auf immunregulatorische Prozesse in der entzündeten Synovialis hin (28, JANOSSY et al., 1981). Funktionelle Tests ergaben Hinweise auf eine mögliche Regulationsfunktion der HLA-DR-Antigene: sie können Suppressoreigenschaften und Interleukin 2-Reaktivität von Suppressor/Zytotoxischen T-Lymphozyten ($T8^+$) verstärken (47, PALACIOS et al., 1983).

Die familiäre Belastung und der bevorzugte Befall von Frauen mit RA deuten auf eine genetisch fixierte Krankheitsdisposition hin.

Von großer Wichtigkeit ist hier die Beobachtung, daß viele Krankheiten mit speziellen, vom Chromosom 6 codierten HLA - Antigen - Typen assoziiert sind, wobei die pathogenetischen

Zusammenhänge meist noch unklar sind (44, OLLIER et al., 1984). Eine Assoziation zwischen RA und einem HLA-Antigen wurde zunächst nicht beschrieben, da nur Klasse I - (HLA-A und -B - Locus) -Antigene untersucht wurden (53, SEIGNALET et al., 1972; 37, LIES et al., 1972).

Gemäß den neueren Untersuchungen korreliert RA jedoch signifikant mit verstärkter Expression HLA - Dw4 - ähnlicher Antigene (55, STASTNY, 1974) und Erniedrigung exprimierter DR2/Dw2 - Antigene auf PBL (62, YOUNG et al., 1983). Noch etwas enger ist RA mit dem HLA-DR4 - Antigen assoziiert (48, PANAYI und WOOLEY, 1977; 54, STASTNY, 1978). Dies wurde sowohl bei der weißen als auch bei der farbigen und mongolischen Bevölkerung beobachtet (44, OLLIER et al., 1984), nicht jedoch bei Thais und Indern (14, DAWKINS et al., 1983).

Bei Frauen wurde darüberhinaus eine positive Korrelation der Dw4 - Gendosis mit der Ausprägungsstärke der RA beschrieben (63, YOUNG et al., 1984). Bei Japanern (43, OHTA, 1982) und Kaukasiern (62, YOUNG et al., 1983) besteht ein Zusammenhang des supertypischen DRw53 - Antigens (HLA-DR4, 7, w9) mit der Gelenkdestruktion bei RA, der noch signifikanter ist, als die Korrelation mit HLA-DR4.

In HLA-DR4⁺Zell-Linien erkennt ein DRw53 - spezifischer MAK 80 % DR-Moleküle und 20 % DQ-Moleküle (31, KATOVICH-HURLEY et al., 1984), so daß auch HLA-DQ - Antigene zur obengenannten Korrelation beitragen können. Daneben ist eine Assoziation zwischen RA und einem Komplementfaktor, dem C4 2.9 bekannt (14, DAWKINS et al., 1983 ; 46, O'NEILL, 1982).

Die Lokalisation HLA-DR - und -DQ - positiver Zellen in mikroanatomisch definierten Arealen der Synovialis ist bisher noch Gegenstand verschiedener Untersuchungen. Auch die Expression polymorpher Strukturen aus dem HLA-D/DR - Bereich durch Zellen des synovialen Infiltrats und die Beziehung HLA-D/DR - positiver Infiltratzellen zu Zellen, die Aktivationsmarker (z.B. den Transferrinrezeptor) exprimieren, wird noch diskutiert.

Die meisten für polymorphe HLA-Klasse II - Antigene spezifischen MAK wurden erst in jüngster Zeit entwickelt.



Ziel der vorliegenden Arbeit war es, infiltrierende Zellen der Synovialis durch Aktivierungsmarker, besonders durch den Transferrinrezeptor - Antikörper 5E9 zu charakterisieren. Die in-situ-Typisierung des synovialen Infiltrates konzentrierte sich auf die morphologischen Eigenschaften (z.B. Lymphozyt), Marker, die mit funktionellen Eigenschaften assoziiert sind (z.B. Helferzelle) und HLA-Expression. Hierbei werden morphologisch definierte Areale der Synovialis (34, KUROSAKA und ZIFF, 1983) zur immunhistochemischen Analyse herangezogen. Durch Vergleich der Markierung polymorpher HLA-Antigene bei stimulierten peripheren Blutleukozyten (PBL) und in der Synovialis kann deren analoge oder gewebsspezifische Expression gezeigt werden.

2. Patienten, Materialien und Methoden

2.1 Patienten; Gewebe- und Blutproben

Synovialgewebe von 15 Patienten mit definitiver und klassischer RA wurde immunhistochemisch untersucht. Dieses Gewebe war jeweils durch Synovektomie gewonnen worden. Die Synovektomie erfolgte in der Staatlichen Orthopädischen Klinik München-Harlaching (13 Fälle) und in der Orthopädischen Klinik des Klinikums Großhadern (2 Fälle).

Parallel dazu wurde peripher-venöses Blut von diesen Patienten zur Untersuchung entnommen. Als "gesunde" Referenzproben diente Synovialgewebe von 5 Patienten, die wegen "veralteter" Kreuzbandruptur (ohne frische Entzündung oder Gelenkerguß) am Kniegelenk arthrotomiert wurden, und von einer Patientin mit Coxarthrose.

Die RA-Patientengruppe läßt sich unterteilen in:

- 10 Patienten mit IgM-Rheumafaktor-positiver RA,
- 5 Patienten mit IgM-Rheumafaktor-negativer RA.

Sämtliche serologischen und hämatologischen Routineuntersuchungen wurden vom Institut für klinische Chemie im Klinikum Großhadern durchgeführt. Die histopathologischen Routinebefunde (vgl. Tabelle 1) wurden vom Institut für Pathologie der LMU erhoben.

2.2.1 Präparation und Lagerung der Synovialisproben

Das Synovialgewebe wurde jeweils sofort postoperativ in sterile, isotonische Kochsalzlösung gegeben, daraufhin in ca. 1 x 0.5 cm große Stücke geschnitten, in Tissue Tek^R eingebettet, und auf Korkscheiben aufgebracht. So vorbereitet wurde das Gewebe über das Zwischenmedium Isopentan (Methylbutan) in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockge-

froren. Das Isopentan war dazu jeweils mindestens 5 Minuten in flüssigem Stickstoff vorgekühlt, aber höchstens 10 Minuten darin belassen worden (um Eiskristallbildung zu verhindern). Die gefrorenen Synovialmembranen wurden bis zum Tag der IP-Färbung bei -80°C gelagert.

2.2.2 Blutentnahme

Das venöse Blut wurde jeweils am Tag der Operation bzw. innerhalb der folgenden Woche mit heparinisierten Glasröhrchen (Vacutainer^R, Becton-Dickinson Corp.) entnommen und sofort weiterverarbeitet (Methode s. 2.4.2).

TABELLE 1 : KLINISCHE DATEN BEI SYNOVEKTOMIE BZW. PE

PATIENT	D ¹	ALTER ² BEGINN	VERLAUF (a)	GESCHL.	CHALKINS- INDEX	RF ³	BSG	HB	PE ⁴ n.W.g/dl	PATHOL. ⁵	THERAPIE ⁶ ANTIRHEUMAT.,BASIS	
P.H.	RA	39	8	w	3	+	18	11.5	HaG	+	Diclofenac	-
K.Id.	RA	48	15	w	3	+	22	13.8	HüG	+	Indomethacin Ibuprofen	Resochin
H.T.	RA	30	17	w	3	+	130	n.d.	KG	+	Diclofenac Ketoprofen	-
M.R.	RA	32	27	w	2	+	10	10.9	HaG	+	Diclofenac Steroide	-
B.E.	RA	34	9	w	3	+	85	9.2	KG	+	Indomethacin	-
M.M.	RA	nd [#]		w	2	+	26	13.6	OSG	+	Diclofenac	-
K.E.	RA	57	17	w	4	++	80	11.6	KG	+	Diclofenac Piroxicam	-
K.I.	RA	nd [#]		w	3	+	nd [*]	11.3	HüG	+	Diclofenac Steroide	D- Penicillam.
M.I.	RA	20	4	w	2	+	10	11.8	KG	+	Calcitonin Piroxicam	Gold
N.J.	RA	31	3	m	4	+	90	11.6	HüG	+	Indomethacin	-
R.M.	ST	12	3	m	4	++	8	12.0	KG	+	Indomethacin Azulfidine	-
A.A.	RA	15	7	w	3	-	30	10.3	HüG	+	Indomethacin	-
S.J.	RA	43	7	m	3	-	34	12.6	KG	+	Diclofenac Steroide	Gold
S.M.	RA	33	20	w	2	-	10	13.4	MCPG	+	Diclofenac	-
E.E.	RA	60	3	w	3	-	25	12.0	HüG	+	Diclofenac Proxen, Steroide	-
T.E.	RA	58	4	m	3	-	54	11.4	KG	+	Ketoprofen Steroide	Gold
G.S.	RA	24	21	w	2	-	15	13.7	EBG	+	Diclofenac	-
R.J.	RA	41	0.5	m	2	-	10	14.5	OSG	+	Piroxicam	-
ALTER BEI SVE/PE												
G.J.	COX	77		w	0	-	25	14.7	HüG	-	Diclofenac	-
L.A.	KR	17		m	0	-	3	16.2	KG	-	-	-
W.D.	KR	15		m	0	-	3	16.6	KG	-	Salicylate	-
W.S.	KR	15		m	0	-	nd [*]	14.5	KG	-	Salicylate	-
P.K.	KR	22		m	0	-	0	16.5	KG	-	-	-
M.W.	KR	27		m	0	-	nd [*]	14.4	KG	-	Diclofenac	-
S.O.	KR	42		m	0	-	nd [#]	14.9	KG	-	Salicylate	-

¹ D = Diagnose (ST=M.Still, COX= Coxarthrose, KR= "veraltete" Kreuzbandruptur)² ALTER BEGINN = Alter in Jahren bei Erkrankungsbeginn³ RF = IgM-anti-IgG-Rheumafaktor (Latex, Waaler-Rose)

⁴ PE = PE-Lokalisation: HaG = Handgelenk (radiocarpal), HüG = Hüftgelenk
 KG = Kniegelenk, OSG = oberes Sprunggelenk (talocrural)
 MCPG = Metacarpo-Phalangealgelenk
 EBG = Ellenbogengelenk (humeroulnar)

⁵ PATHOL.= Pathologie-Befund: + = histopathologisch gut vereinbar mit RA
 - = histopathologisch kein Anhalt für RA-Synovitis

* = präoperativer Befund nicht erhoben

= nicht exakt zu bestimmen

2.3 Verwendete monoklonale Antikörper (MAK)

Die im Folgenden beschriebenen MAK wurden in der vorliegenden Arbeit größtenteils sowohl in der Immunhistochemie (IP-Methode) als auch im Single-Cell-ELISA (SCE) verwendet, ein kleiner Teil der MAK kam nur in einer der beiden Methoden zum Einsatz. Die meisten hier verwendeten MAK stammen aus dem Institut für Immunologie der LMU, einige wenige wurden käuflich erworben. Eine Übersicht über Immunglobulin-Isotyp, Spezifität und Herkunft der MAK gibt Tabelle II.

2.3.1 MAK T29/33

T29/33 ist ein Immunglobulin der Subklasse IgG_{2b}, das ein Glykoprotein mit dem Molekulargewicht von 220 kd (auf B-Lymphozyten) bzw. 200 kd (auf T-Lymphozyten) erkennt. Dieses Glykoprotein, das sogenannte T200, findet sich auf allen hämatopoietischen Zellen (einschließlich Leukämie- und Lymphomzellen) des Menschen (45, OMARY et al., 1980), nicht aber auf anderen Zellgruppen.

2.3.2 MAK M-T 11.10

M-T 11.10 hat den Isotyp IgG₁. Er erkennt ein 55 kd Antigen, das mit dem SRBC-Receptor assoziiert ist (T 11 Antigen). Von M-T 11.10 werden alle reifen T-Zellen und alle Thymozyten markiert (vgl. Tabelle II).

2.3.3 MAK M-T 8.11

M-T 8.11 ist ein MAK der Subklasse IgG₁. Er reagiert mit einem Protein aus zwei Polypeptidketten von jeweils 34 kd und 32 kd. M-T 8.11 ist ein Marker für Suppressor/Zytotoxische T-Zellen, eine Subpopulation der T-Lymphozyten (25[±] 10 % der PBL).

Alloantigen induzierte zytotoxische T-Zellen gehören ausschließlich der M-T 8.11⁺ Untergruppe an, wie funktionelle Zellanalysen zeigten (52, RIEBER et al., 1981). Killer-T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK) exprimieren das M-T 8.11 - Antigen zu 50 % (39, LOHMEYER et al., 1981). Die pokeweed-mitogen (PWM) - induzierte in-vitro - Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen wird durch M-T 8.11-positive Zellen supprimiert.

2.3.4 MAK M-T 3.10

M-T 3.10 ist ein IgG₁. Über ein 55 kd-Antigen erkennt er ca. 80 % der Thymozyten und ca. 60 % der reifen T-Zellen. Die markierten T-Zellen gehören dem Helfer/Inducer-Typ an. Das zugehörige Antigen entspricht dem L3T4a der Maus und ist MHC-Klasse II restringiert (vgl. Tabelle II).

2.3.5 MAK 63D3

Der MAK 63D3 gehört der IgG₁ - Subklasse an. Er bindet an ein Molekül, welches aus einer Polypeptidkette vom MG 200 kd besteht. Dieses Molekül findet sich auf den meisten, wenn nicht allen Monozyten aus dem peripheren Blut (58, UGOLINI et al., 1980), aber auch auf normalen menschlichen Granulozyten und auf Tumorzellen aus granulozytären Leukämien. 63D3 reagiert mit weniger als 0.1 % der T-Lymphozyten (58, UGOLINI et al., 1980) und ist areaktiv mit B-Zellen.

2.3.6 MAK Anti-LeuM3

Anti-Leu M3 ist ein IgG_{2b} der Maus. Dieser MAK erkennt Monozytenantigene. Das MG des markierten Moleküls ist nicht bestimmt. Anti-Leu M3 wurde käuflich erworben von der Fa. Becton - Dickinson (vgl. Tabelle II und 17, DIMITRU-BONA et al., 1983).

2.3.7 MAK 5E9

Bei 5E9 handelt es sich um einen MAK vom Isotyp IgG₁. Das von 5E9 markierte Antigen ist ein Glykoprotein (Transferrin-Receptor) und hat unter reduzierenden Bedingungen ein MG von 90 kd. Unter nichtreduzierenden Bedingungen ist es ein disulfidgekoppeltes Dimer von ca. 190 kd MG. 5E9 erkennt 40 - 80 % der Concanavalin A (ConA), PHA- oder PWM-aktivierten peripheren Blutleukozyten dazu Sezäryzellen und PBL aus akuten myeloischen und lymphatischen Leukämien. 5E9 reagierte mit allen hämatopoietischen und nicht-hämatopoietischen Zell-Linien, mit denen er getestet wurde, mit 11 ± 1 % der Thymozyten und mit 40 % der mononukleären Knochenmarkszellen (26, HAYNES et al., 1981). 5E9 definiert ein menschliches Zelloberflächen-Antigen mit dem MG 90 kd, das auf proliferierenden normalen und malignen Zellen, nicht aber auf der Mehrzahl der PBL exprimiert wird. Der MAK 5E9 kann somit ein Marker der Zellaktivierung beim Menschen sein (26, HAYNES et al., 1981).

2.3.8 MAK L243

L243 ist ein MAK der Subklasse IgG₂. Er bindet an monomorphe HLA-DR-Antigene. In der Immunpräzipitation mit ¹²⁵Iod-markierten NP 40-Extrakten der menschlichen B-Zell-Linie Raji präzipitiert L243 zwei DR - Moleküle ($\alpha\beta_1$, $\alpha\beta_2$) vom MG 34 kd bzw. 28 kd (35, LAMPSON und LEVY, 1980). Die von L243 erkannten Moleküle auf menschlichen B-Lymphozyten sind den Ia-Molekülen der Maus ähnlich.

L243 bindet an menschliche B-, nicht aber an T-Zell-Linien und ist zytotoxisch für menschliche Zellen (35, LAMPSON et al., 1980).

Die N-terminale Aminosäuresequenz der schweren Kette (α) von DR, welche von L243 erkannt wird, ist identisch mit der bekannten Sequenz der biochemisch isolierten DR-schweren Kette

(6, BONO und STROMINGER, 1981), welche wiederum homolog ist zur "heavy chain" von I-E der Maus.

2.3.9 MAK L227

Bei L227 handelt es sich um ein IgG₁ der Maus. Dieser MAK präzipitiert ein HLA-DR-Produkt (möglicherweise $\alpha\beta_1$) in der Immunpräzipitation mit ¹²⁵Iod-markierten Raji-B-Zellen. Dabei erkennt L227 ein Molekül vom MG 25 kd, eine monomorphe DR-Determinante, zusätzlich zu den 34 kd und 28 kd - Molekülen, an welche auch L243 bindet (35, LAMPSON und LEVY, 1980). L243 ist nicht zytotoxisch für menschliche Zellen.

2.3.10 MAK Tü22

Der MAK Tü22 ist ein Immunglobulin G der Maus. Er erkennt ein monomorphes DQ- (bzw. DR) - Antigen, ein Heterodimer ($\alpha\beta$) vom MG 46 kd (60, WERNET et al., 1983).

In Inhibitionsexperimenten hemmt Tü22 die Stimulation sogenannter geprimter (vorimmunisierter) Zellen, die für HLA-DQ spezifisch sind. Die Stimulation der für SB geprimten Zellen bleibt durch Tü22 unbeeinflusst, HLA-DR - spezifische Zellen werden durch Tü22 geringfügig inhibiert. (56, STEEL et al., 1984).

2.3.11 MAK R3E11

R3E11 ist ein Vertreter der Immunglobulin-Subklasse IgM. Er erkennt eine HLA-DR β_2 -Kette, eine DRw52 - ähnliche Determinante (supertypisch für DR3, 5, w6, w8).

In der Immunpräzipitation gegen eine ¹²⁵Iod-markierte lymphoblastoide Zell-Linie "Sch" präzipitiert R3E11 zwei Moleküle: ein α mit 37 kd und ein β mit 31 kd Molekulargewicht (29, JOHNSON und WANK, 1984). Damit präzipitiert R3E11 ähnliche

Moleküle wie 16.23, S2 und S3 (s. Tab. II). Monoklonale Antikörper, die gegen polymorphe HLA-Klasse II-Determinanten gerichtet sind, konnten in Studien allospezifischer T-Zell-Klone zeigen, daß funktionell verschiedene Zellen unterschiedliche HLA-D-Region-Produkte exprimieren können.

2.3.12 MAK 16.23

Der zytotoxische MAK 16.23 hat den Isotyp IgG₃. Er wurde durch einmalige Immunisierung einer BALB/c-Maus mit der menschlichen Melanom-Zell-Linie Mel JuSo gewonnen (30, JOHNSON et al., 1982). 16.23 ist gegen ein HLA-gekoppeltes Antigen gerichtet, welches eng mit HLA-D/DR 3 assoziiert ist. In der Immunpräzipitation mit ¹²⁵Iod-markierten B-Zellen (aus Mel JuSo, bzw. Raji) erhält man durch 16.23 eine α -Kette mit 37 kd MG und eine β -Kette mit 31 kd. Zusätzlich präzipitiert 16.23 mit autologen B-Zellen (JuSo B) ein Molekül von 28 kd MG (30, JOHNSON et al., 1982).

Die von 16.23 erkannte Struktur liegt auf der β -Kette des Klasse II-Moleküls. Das dadurch definierte Antigen ist in der Bevölkerung polymorph exprimiert und wird gemeinsam mit HLA vererbt.

2.3.13 MAK Genox3.53 und

2.3.14 MAK HB109

Genox3.53 entstand aus Fusion der Maus-B-Zell-Linie "Daudi" (DR3⁺, DR6⁺) mit der BALB/c-Myelom-Zell-Linie MOPC 21.

Genox3.53 ist ein MAK mit dem Isotyp IgG₁.

Er erkennt ein HLA-Klasse II- $\alpha\beta$ -Heterodimer, das dem HLA - Sublocus DQ zuzuordnen ist, genauer der Spezifität DQw1 (56, STEEL et al., 1984; 7, BRODSKY und PARHAM, 1980).

Genox3.53 bindet an Alveolarmakrophagen und zwar spezifisch an DR und nicht über Fc-Rezeptoren (8, BRODSKY, 1984).

MAK HB 109 entstand durch "class-switch" aus Genox3.53 - produzierenden Plasmazellen.

HB109 gehört zur Immunglobulin-Subklasse IgG_{2a} und wurde durch Isotyp-Selektionierung aus Genox3.53-Klonen gewonnen (50, PARHAM et al., 1983). Erkanntes Molekül und Spezifität sind für HB109 und Genox3.53 identisch.

2.3.15 MAK R1A1

Bei R1A1 handelt es sich um ein Immunglobulin M. R1A1 entstand durch Fusion von Milzzellen einer weiblichen Maus (C57BL/6 x BALB/c - F₁) mit Maus - Myelomzellen. Die Maus war zuvor mit Zellen der lymphoblastoiden Zell-Linie Rebma (HLA-A2, Bw60, Cw3, DRw6) immunisiert worden. Der MAK R1A1 erkennt ein polymorph-vertretenes HLA-DQw1-ähnliches Molekül, das auf DRw6-homozygoten Zellen exprimiert wird (29, JOHNSON und WANK, 1984).

Die durch R1A1 präzipitierte α -Kette hat ein MG von 34 kd, die β -Kette eine MG von 30 kd.

Das durch R1A1 definierte Antigen ist ein häufig repräsentiertes Molekül auf DRw6-homozygoten Zellen (wie auch das verwandte Antigen des MAK S1G10).

2.3.16 MAK S1G10

Der MAK S1G10 gleicht im Isotyp und in der Spezifität dem MAK R1A1.

S1G10 unterscheidet sich jedoch im Epitop von R1A1: es gibt R1-positive und gleichzeitig S1-negative Haplotypen.

Das Auftreten des S1G10 - Antigens dagegen, ist abhängig von der Anwesenheit des R1A1 - Moleküls (29, JOHNSON und WANK, 1984).

Herkunft und Spezifität weiterer, hier nicht beschriebener Antikörper, welche im SCE Verwendung fanden, geht aus Tabelle II hervor.

TABELLE 11 : MONOKLONALE ANTIKÖRPER

NAK	ISOTYP	SPEZIFITÄT	MOLEKULARGEWICHT-ANTIGEN	BEMERKUNGEN	QUELLE	LITERATUR
T29/33	IgG _{2b}	"Human common leucocyte antigen T200"	220 kd (B-Zellen) 200 kd (T-Zellen)	glykoprotein	Hybritech ¹	<u>28</u>
M-T 11.10	IgG ₁	alle Thymozyten und reifen T-Zellen	55 kd	SRBC-Rezeptor assoziiert	Rieber ²	<u>29</u>
M-T 8.11	IgG ₁	(T8 ⁺) T-Suppressor/ Zytotoxische T-Zellen	zweikettiges Protein 34 kd, 32 kd	erkennt 50% NK-Zellen	Rieber	<u>30</u> , <u>31</u>
M-T 3.10	IgG ₁	(T4 ⁺) T-Helfer/ Inducer T-Zellen	55 kd	MHC-Klassell restringiert	Rieber	<u>29</u>
6303	IgG ₁	Monozyten	200 kd-Polypeptid	erkennt auch Granulozyten	ATCC ³	<u>32</u>
anti-Lei/B	IgG _{2b}	Monozyten	nd ⁴		Becton Dickinson ⁵	<u>33</u>
SE9	IgG ₁	Transferrin-Rezeptor	90 kd(reduz.)Glykoprot.	nicht auf den meisten FBL	Rieber	<u>34</u>
L243	IgG _{2a}	HLA-DR (β -Kette) monomorph	34 kd (α_1) 28 kd (α_2)	zytotoxisch f. menschl. Zell.	ATCC	<u>35</u> , <u>36</u>
L227	IgG ₁	HLA-DR, monomorph	25 kd	nicht zyto- toxisch	ATCC	<u>35</u> , <u>36</u>
2.06	IgG _{2a}	HLA-DR (DP?), monomorph	heterogen 28 kd - 34 kd		ATCC	<u>53</u> , <u>38</u>
TU 22	IgG	HLA-DQ (DR), monomorph	46 kd ($\alpha\beta$)		Johnson ²	<u>37</u> , <u>38</u>
R3E11	IgM	HLA-DRA62-"like" (β -Kette)	37 kd (α) 31 kd (β)		Johnson	<u>39</u>
16.23	IgG ₃	HLA-DR 3, DRw13 (β -Kette)	37 kd (α), 31 kd (β) 28 kd (auf autolog.B-Z.)	zytotoxisch	Johnson	<u>40</u>
Genox3.53	IgG ₁	HLA-DQw1	nd, ($\alpha\beta$ -Heterodimer)		ATCC	<u>38,41,42</u>
HB 109	IgG _{2a}	HLA-DQw1	nd, ($\alpha\beta$ -Heterodimer)	class-switch Variante v.3.53	ATCC	<u>38</u> , <u>43</u>
R1A1	IgM	HLA-DQw1-"like"	34 kd (α) 30 kd (β)		Johnson	<u>39</u>
S1G10	IgM	HLA-DQw1-"like"	34 kd (α) 30 kd (β)	R1 ⁺ ,S1 ⁺ möglich	Johnson	<u>39</u>
MPC 11	IgG _{2b}	keine bekannt	--	Haus-Myelom	ATCC	<u>45</u>
HB 28	IgG _{2b}	β_2 -mikroglobulin	12 kd		ATCC	<u>46</u>
w6/32	IgG _{2a}	HLA-A,B,C-assoziiertes Glykoprotein	nd	erkennt ande- re z.als HB28	ATCC	<u>47</u>
HB 59		HLA-B7, B40			ATCC	<u>48</u>
BB 7.1	IgG ₁	HLA-B7			ATCC	<u>50</u>
ME - 1		HLA-B7, Bw22, B27		bindet 75E- 100H/HLA-B27 ⁷	ATCC	<u>49</u>

¹Hybritech Inc., San Diego, CA, U.S.A. - ²Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Goethestr. 31 8000 München 2 - ³American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U.S.A. - ⁴nd, not determined - ⁵Becton-Dickinson, Mountain View, CA, U.S.A.

2.4. Methoden

2.4.1 Immunhistochemie - Immunperoxidase-Färbung (IP)

Die Immunperoxidase-Färbung wurde, mit leichten Veränderungen nach dem von STEIN et al. beschriebenen Verfahren durchgeführt (57, STEIN et al., 1982).

Zunächst wurden im Kryostaten (Frigocut 2700, Fa. Reichert-Jung, Heidelberg, BRD) bei -25°C Gefrierschnitte der Dicke $5\text{ }\mu\text{m}$ angefertigt und auf gereinigte (in einem Gemisch aus Ether und 70 % Ethanol) Objektträger aufgebracht. Da die Färberegebnisse nach Lyophilisation des Gewebes qualitativ nicht von den Ergebnissen ohne Lyophilisation zu unterscheiden waren, wurde auf das Lyophilisieren der Synovialis verzichtet.

Die unfixierten Schnitte wurden für mindestens drei Stunden bei Zimmertemperatur luftgetrocknet und dann, ebenfalls bei Zimmertemperatur für eine Stunde mit monoklonalem Antikörper (jeweils $100\text{ }\mu\text{l}$ verdünnter MAK pro Schnitt) inkubiert.

Diese Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer, die jeweilige Verdünnung des MAK ist Tabelle II zu entnehmen.

Nach der Inkubation mit MAK wurden die Gewebeschnitte dreimal in PBS gewaschen.

Dann wurden sie für 30 min mit je $100\text{ }\mu\text{l}$ Peroxidase-gekoppeltem Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin (P260, Fa. DAKOPATTS, Kopenhagen, Dänemark) behandelt. Dieses Immunglobulin ist mit insolubilisierten menschlichen Serumproteinen reabsorbiert und wurde in der Verdünnung 1:100 in PBS/20 % Humanserum verwendet. Das Humanserum wurde zugegeben, um eventuelle Kreuzreaktivität dieses Reagenz gegen humanes IgG zu verhindern.

Nach dieser Inkubation wurden die Gewebeschnitte dreimal in PBS gewaschen. Schließlich erfolgte, zur Verstärkung der anschließenden Farbreaktion eine weitere Inkubation, diesmal mit Peroxidase-gekoppeltem Schwein-anti-Kaninchen-Immunglobulin (P217, DAKOPATTS, Kopenhagen, DK), bei gleicher Verdünnung (1:100 in PBS/20 % HS).

Im Anschluß daran wurde erneut dreimal in PBS gewaschen, dann erfolgte die Farbreaktion: die Schnitte wurden für 20 min in einer dicht geschlossenen Küvette mit folgender Lösung belassen:

- 20 mg Carbazol (SIGMA-Chemicals No.A-5754),
gelöst in
- 12 ml DMSO (MERCK Art. 802912),
verdünnt mit
- 280 ml PBS*,
danach Zugabe von
- 10 μ l H_2O_2 30 % (MERCK, Art. 8599).

Zuletzt wurden die Gewebeschnitte in PBS gewaschen, mit Hämalaun (saures Hämalaun nach Mayer, Apotheke der Kliniken der LMU) gegengefärbt (für 1 min) im PBS-Bad gebläut (10 min) und mit warmer Glycerin-Gelatine und Deckgläschen eingebettet. Die Auswertung erfolgte mit einem LEITZ-Lichtmikroskop mit Rasterokular (10 x).

Zur quantitativen Auswertung wurden jeweils 5 Gesichtsfelder ("high power fields", Objektiv 100 x) typischer Areale eines Präparates von zwei unabhängigen Untersuchern ausgezählt.

* Der PBS (pH 7.2, 0.15 M)-Ansatz:

NaCl-8.00g, Na_2HPO_4 x $2H_2O$ -1.15 g
KCl -0.20g, KH_2PO_4 - 0.20 g

+ Aqua demin.ad 1.00 l

2.4.2 Single - Cell - ELISA (SCE)

Der Single - Cell - ELISA wurde nach dem von HOLZMANN und JOHNSON beschriebenen Verfahren durchgeführt (27, HOLZMANN und JOHNSON, 1983). Dazu wurden Lymphocyten aus dem peripheren Blut durch Dichte-Gradienten-Zentrifugation isoliert. Im Einzelnen kam folgende Methode zur Anwendung:

Jeweils 10 ml Vollblut wurden mit 40 ml PBS verdünnt und in zwei Portionen auf je 15 ml Ficoll-Paque^R (Pharmacia, Uppsala, Schweden) überschichtet.

Nach 30minütiger Zentrifugation wurden mononukleäre Zellen aus der Interphase-Bande isoliert (Methode s. 5, BØYUM et al., 1968). Die so erhaltenen Zellen wurden, nach zweimaligem Waschen in PBS, zusammen mit Kulturmedium RPMI 1640 (Fa. Gibco, mit Zusatz von Penicillin/Streptomycin und 10 % FCS) in Gewebekulturflaschen (Falcon Corp., USA) übertragen und nach Zugabe von 0.1 % Phytohämagglutinin (PHA) für vier Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die derart stimulierten lymphoblastoiden Zellen wurden nun im SCE auf TERASAKI-Platten (Nunc Products, Roskilde) getestet. Dazu wurde nach der obengenannten Methode verfahren, die im Folgenden kurz beschrieben wird:

Zunächst wurde die Terasaki-60-Loch-Platte für 20 bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert mit 5-10 µl Poly-L-Lysin (MG 190 kd, 25 µg/ml) pro Loch. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit PBS pH 7.2 und Abtrocknen der Plattenoberfläche wurden die Testzellen einpipettiert. Diese Testzellen waren nach Entnahme aus der Gewebekultur dreimal mit PBS gewaschen und auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml Lösung verdünnt worden (bei 5 µl Lösung pro Loch entspricht das ca. 1500 Zellen/Loch).

Die Platte mit den zugegebenen Testzellen wurde nun für 5 min bei 600 U/min zentrifugiert und für 5 min mit 10 ml 0.1 % Glutaraldehyd (MERCK Art. 820603) fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Platte abgetrocknet und für eine Stunde mit 10 ml 0.1 % Gelatine-PBS (SIGMA No. G-9382) gefüllt. Die Gelatine wurde abgekippt, die Platte abgetrocknet.

Es folgte die eigentliche Testinkubation:

5 μ l MAK/Loch wurde zugegeben und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der nichtgebundene MAK ausgewaschen (10maliges Waschen in PBS), die Platte abgetrocknet.

Zur Nachweis-Inkubation wurden je 5 μ l Peroxidase-gekoppeltes Immunglobulin (Kaninchen-anti-Maus-Ig, P260, Fa. DAKOPATTS, Kopenhagen, DK) in der Verdünnung 1:100 (in PBS/10 % FCS) zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur belassen. Das nicht gebundene Kaninchen-Ig wurde abgewaschen (10maliges Waschen in PBS), die Platte wurde abgetrocknet. Den Abschluß bildete die Nachweisreaktion: Pro Terasakiplatte wurde 10 ml Nachweissubstrat* zugegeben. Nach 15 min wurde das Substrat abgegossen und die Platte mit PBS gefüllt. Die Auswertung erfolgte mit einem inversen Lichtmikroskop (Fa. Leitz). Hierbei waren die positiven Zellen an einer braunen Membranfärbung zu erkennen. Als Negativkontrolle diente der MAK mpc 11 (s.Tab.II).

* Nachweissubstrat: 2.0 mg Carbazol (SIGMA No. A-5754) in
12 ml DMSO (MERCK Art.802912), dazu
28.8 ml PBS (pH 7.2, 0.15 M) und
5 μ l H₂O₂ 30 % (MERCK Art. 8589)

3. Ergebnisse

Expression von MHC- und Differenzierungsantigenen auf Zellen der Synovialis und auf PBL bei Rheumatoider Arthritis.

3.1 Immunhistochemische Analyse infiltrierender Zellen der Synovialis

Synovialisgewebe von 15 Patienten mit RA, von 3 Patienten mit "veraltetem" Kniegelenkstrauma und von einer Patientin mit Coxarthrose (vgl. 2.1, 2.2) wurde nach der Immunperoxidase-methode (vgl. 2.4.1) gefärbt. Als Antigenmarker kamen hierbei 16 verschiedene MAK (s. Tabelle II) zur Verwendung. Die Ergebnisse sind als Übersicht in Tabelle III dargestellt.

3.1.1 Morphologische Charakteristika

Bei der Beurteilung der Synovialis wurden morphologische Gesichtspunkte berücksichtigt:

Nicht die Synovialis-Deckzellen, sondern die Subintimalschicht der Synovialis mit ihren zum Teil massiven lympho-plasmazellulären Infiltraten war Gegenstand der Betrachtung.

In allen untersuchten Fällen von RA fanden sich subintimale Infiltrate, während Deckzellproliferation bisweilen nicht nachweisbar war. Zudem wurde eine Synovitis vom Intimaltyp, das heißt Deckzellproliferation auch bei arthrotischen Gelenken beschrieben (18, DREHER, 1983).

Die Subintimalschicht wurde in Anlehnung an eine Darstellung von KUROSAKA und ZIFF (34, 1983) in drei verschiedene Areale perivaskulärer Infiltration unterteilt:

- Follikuläre Areale: Hier findet sich eine dichte Ansammlung, vorwiegend kleiner Lymphozyten ("lymphocyte-rich areas", 12, ZIFF, 1983, p. 1196).

- **Transitionale Areale:** Diese bestehen aus Lymphozyten, Plasmazellen und makrophagenähnlichen Zellen (33, KOBAYASHI und ZIFF, 1973). Die Infiltratzellen sind hier allgemein größer und lockerer verteilt, das heißt das Infiltrat ist weniger dicht.
- **Interstitielle Areale:** Neben den Rundzellinfiltraten gibt es in der synovialen Subintimalschicht Areale elongierter, fibroblasten- aber auch makrophagenähnlicher Zellen (vgl. Abb. 3).

Bei der semiquantitativen Auswertung der Präparate wurden von jedem dieser Areale jeweils fünf Gesichtsfelder im Lichtmikroskop (vgl. 2.4.1) betrachtet. Waren weniger als 5 % der untersuchten Zellen positiv, so wurde dem entsprechenden Areal ein $\circ$, bei 5 bis 40 % positiven Zellen ein $\square$, und bei mehr als 40 % positiven Zellen ein $\blacksquare$ zugeordnet (s. Tabelle II).

3.1.2. Ergebnisse mit den einzelnen monoklonalen Antikörpern (MAK)

Als Negativkontrolle diente gereinigtes Immunglobulin G der Maus. In keinem Fall zeigte sich hiermit eine positive Reaktion bei der Immunperoxidasefärbung.

Mit MAK T 29/33 (Beschreibung s.2.3), dem Marker des "human common leucocyte antigen T200", ließen sich in allen Fällen, auch bei den non-RA-Patienten, infiltrierende knochenmarksstämmige Zellen nachweisen. Vor allem perivaskulär, in den Lymphfollikeln und in den transitionalen Regionen war der größte Teil der Zellen positiv mit T 29/33 (s. Abb. 1).

Nur interstitiell, also neben den perivaskulären Infiltraten lagen Areale ohne T 29/33-positive Zellen; dies konnte in 3 von 15 Fällen (20 %) bei RA-Patienten und in 2 von 4 Fällen (50 %) bei Nichtrheumatikern beobachtet werden.

Eine im Vergleich zu den non-RA-Patienten stärkere Gewebsinfiltration war auch rein morphologisch in der Synovialis der RA-Patienten festzustellen.

Bei der Hälfte der non-RA-Synovialisproben waren auch bei mehrfacher Untersuchung keine Lymphfollikel darstellbar, so daß die Bezeichnung "follikuläres Areal" hier im engeren Sinn nicht gerechtfertigt erscheint. Zum besseren Vergleich wurde jedoch die Einteilung auch für die non-RA-Fälle belassen, so daß mit "follikulärem Areal" ein Gewebsbezirk mit lymphocytärer Infiltration gemeint ist. Auch in den nicht-rheumatischen Synovien zeigte sich nämlich immer eine, wenn auch oft nur geringgradige, Infiltration mit MAK 11.10-positiven Zellen, das heißt mit T-Lymphozyten: 4 von 4 der non-RA-Gewebe verhielten sich geringgradig positiv (40 % positive Zellen) für M-T 11.10 im follikulären Areal.

Der MAK M-T 11.10 (Beschreibung s. 2.3.2) reagierte bei 13 (= 87 %) der 15 untersuchten RA-Synovialisproben mit mehr als 40 % der Zellen in follikulären Arealen. In 2 von 15 Fällen (13 %) sind hier zwischen 5 und 40 % der untersuchten Zellen positiv für M-T 11.10.

Der starken T-Zellinfiltration in den Lymphfollikeln (vgl. Abb. 2) stehen nur vereinzelte T-Zellen in den transitionalen Arealen gegenüber: Bei 13 von 15 RA-Patienten waren hier zwischen 5 und 40 % M-T 11.10-positive Zellen zu sehen. Bei zwei RA-Patienten konnten wir in den transitionalen Arealen keinerlei

M-T 11.10 - positive T-Zellen nachweisen.

Transitional lagen bei der Hälfte der Nichtrheumatiker wenige T-Zellen (weniger als 40 % M-T 11.10⁺) vor, bei der anderen Hälfte verhielt sich das transitionale Gewebe völlig negativ mit MAK M-T 11.10.

In keinem Fall, weder bei RA, noch bei Nichtrheumatikern konnten im interstitiellen Areal T-Lymphozyten durch Markierung mit MAK M-T 11.10 dargestellt werden (vgl. Abb. 3).

Im Folgenden werden die Ergebnisse für monoklonale Marker von T-Lymphozyten - Subpopulationen zusammengefaßt:

In 8 Fällen (53 %) von RA fanden sich massive Infiltrate mit M-T 3.10 - positiven T-Helferzellen in den Lymphfollikeln der Subintimalschicht (vgl. Abb. 4). Sechs (40 %) RA-Patienten wiesen hier geringe bis mäßige Helferzellinfiltrate auf, ein Fall verhielt sich hier negativ mit M-T 3.10. (Beschreibung des MAK s. 2.3.4).

Die transitionalen Areale waren in 3 Fällen (20 %) von RA stark, in 9 Fällen (60 %) mäßig und in weiteren 3 Fällen (20 %) gar nicht mit M-T 3.10 - positiven Zellen durchsetzt. Bei Betrachtung der interstitiellen Areale stehen bei RA vier Fälle geringer Infiltration mit T-Helferzellen elf Fällen fehlender M-T 3.10 - positiver Zellen gegenüber. Dieses Ergebnis bedarf im Zusammenhang mit dem völligen Fehlen M-T 11.10 - positiver Zellen in den interstitiellen Regionen noch der Diskussion (vgl. 4.1).

In allen außer drei Arealen (s. Tabelle IV) waren bei RA weniger Zellen positiv für M-T 8.11 (vgl. Abb. 5)-Suppressor-Antigene (Beschreibung des MAK s. 2.3.3) als für M-T 3.10. So waren hier nur in einem Fall mehr als 40 % M-T 8.11 - positive Zellen in den Lymphfollikeln zu sehen, in 13 Fällen fand sich eine geringe Suppressor-T-Zellinfiltration der lymphozytären Areale und in einem Fall waren Suppressor-T-Zellen hier völlig abwesend.

In den transitionalen Regionen wurden 8 Fälle geringer Infiltration und 7 Fälle ohne nachweisbare Suppressor-T-Zellen

(M-T 8.11^+) beobachtet, während die interstitiellen Areale allesamt keinerlei Suppressorzellen aufzeigten. Das intraindividuelle Verhältnis der T-Zell-Subpopulationen in den Regionen der synovialen Subintima bei RA geht aus nachfolgender Tabelle hervor:

Tabelle IV

Verteilung der T-Zell-Subpopulationen in der Synovialis
(Subintimalschicht)

areal \ PAT.	1																2																	
	P.	H.	K.	H.	M.	R.	B.	E.	M.	M.	K.	E.	I.	M.	N.	I.	A.	A.	S.	J.	S.	M.	E.	E.	T.	E.	G.	J.	L.	A.	W.	D.	W.	S.
follikulär	◆	-	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	○	+	◆	○	◆	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	+	○	○	-	-	-
transitional	○	-	○	○	○	◆	○	◆	○	◆	○	◆	+	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	-	○	◆	◆	◆	◆
interstiell	◆	-	◆	◆	◆	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Symbole: ¹RA-Patienten (* = seronegativ), ²Non-RA-Patienten
 ◆ = mehr T-Helfer- als T-Suppressorzellen ($3.10^+ > 8.11^+$)
 + = " T-Suppressor- als T-Helferzellen ($3.10^+ < 8.11^+$)
 ○ = Anzahl gleich ($T_H = T_S$); - = weder T_H noch T_S markiert

Symbole: ¹RA-Patienten (= seronegativ)

²Non-RA-Patienten

= mehr T-Helfer- als T-Suppressorzellen
 ($3.10^+ > 8.11^+$)

= mehr T-Suppressor- als T-Helferzellen
 ($3.10^+ < 8.11^+$)

= Anzahl gleich ($T_H = T_S$)

= weder T_H noch T_S markiert

Im Follikulären Areal wurde die Überzahl an T-Helferzellen am deutlichsten: in 8 Fällen von RA waren hier mehr M-T 3.10 - positive Zellen als Suppressorzellen (M-T 8.11^+) vorhanden, während nur in einem Fall die T-8-positiven Zellen überwogen (s. Tabelle IV).

Bei den Nichtrheumatikern war in keinem Fall ein Vorherrschen der T-Helferzellen in den lymphocytären Arealen festzustellen. Ohnehin wurde bei den non-RA-Patienten stets nur eine geringe Infiltration mit T-Helfer- bzw. Suppressorzellen beobachtet. Das Verhalten der T-Zell-Subpopulationen in den makrophagenreichen transitionalen Arealen (Prädominanz der T-Helferzellen in 6 Fällen von RA und in zwei non-RA-Fällen) und in den interstitiellen Regionen (T-Helfer-Zellinfiltrate bei Negativität mit M-T 11.10 und M-T 8.11 in vier Fällen von RA) wird an anderer Stelle noch diskutiert (vgl. 4.1).

Monozyten/Makrophagenantigene konnten vor allem in den transitionalen Regionen (vgl. Abb. 6) nachgewiesen werden: In 14 Fällen (93 %) von RA war hier der weitaus größte Teil der Zellen positiv mit MAK 63D3 (Beschreibung s. 2.3.5), nur in einem Fall lagen wenige 63D3⁺ Monozyten/Makrophagen vor (vgl. Tabelle III, Pat. K.Id.).

Der Anteil an 63D3⁺ Makrophagen in den Lymphfollikeln war durchweg nur gering bis mäßig: in 14 Fällen zeigte sich geringe, in einem Fall gar keine positive Reaktion mit dem MAK 63D3. Die fibroblastenreichen interstitiellen Areale verhielten sich unterschiedlich bei Markierung mit 63D3: ein Teil (8 Fälle von RA) zeigte geringe Infiltration mit 63D3 - positiven Zellen, der andere Teil (7 Fälle von RA) enthielt keine 63D3-markierten Zellen.

Mit dem Makrophagen - spezifischen MAK Leu M3 (Beschreibung s. 2.3.6) ergaben sich, bis auf eine einzige Ausnahme (vgl. Tab.III, Pat. B.E.), die gleichen Ergebnisse wie mit 63D3. Durch Untersuchung von Serienschnitten konnte die weitgehende Übereinstimmung 63D3- und Leu M3-markierter Zellen in den transitionalen Arealen morphologisch erhärtet werden.

Die 63D3- und Leu M3-markierten Zellen waren hier meist größer als die Zellen in den Lymphfollikeln und wiesen wechselnde, zum Teil dendritische Form auf.

Das transitionale Areal der synovialen Subintima, welches auch als immunologisch aktives Areal bei RA angesehen wird

(34, KUROSAKA und ZIFF, 1983), besteht aufgrund obiger Markierungsbefunde anscheinend zum größten Teil aus Zellen des Monozyten Makrophagen - Typus.

Ein "Überlappen" der 63D3-positiven Zellen mit den MAK 5E9 (s. 2.3.7) - markierten Zellen, vor allem in der transitionalen Region, ließ sich anhand von Serienschnitten verdeutlichen (s. Abb. 6, 7).

Die makrophagenreichen Bezirke der Synovialis bestehen bei RA zumeist aus 5E9-positiven Zellen:

- bei 9 Gewebeproben exprimierten mehr als 40 %,
- bei 5 Gewebeproben exprimierten weniger als 40 % der Infiltratzellen den Transferrinreceptor,
- bei 1 Gewebeprobe war das Transferrinreceptor-Antigen nicht nachweisbar.

Der MAK 5E9 reagiert bei RA "selektiver" mit Zellen des makrophagenreichen Areal, als die beiden Monozyten/Makrophagen-spezifischen MAK 63D3 und Leu M3: 5E9 zeigt nur in einem Fall starke, in 8 Fällen mäßige und in 6 Fällen keinerlei Reaktion in den Lymphfollikeln.

Erwähnenswert erscheint vor allem, daß sich mit dem Transferrinreceptor-Antikörper 5E9 bei den non-RA-Patienten durchweg keine positive Reaktion im transitionalen Areal gezeigt hat (vgl. Tabelle III, s. Abb. 8), während die Mo/Mφ-Marker hier immer an einen Teil der Zellen banden. Das gehäufte Auftreten Transferrinreceptor-positiver Zellen in der rheumatoiden Synovialis ist bereits von anderen Untersuchern erwähnt worden (63, YOUNG, C.L. et al., 1984), die nur Lymphozyten, nicht aber Monozyten/Makrophagen in der Synovialis untersucht hatten.

Die Ergebnisse mit dem MAK 5E9 und 63D3 werden noch an anderer Stelle (vgl. 3.2) im q u a n t i t a t i v e n Vergleich erörtert.

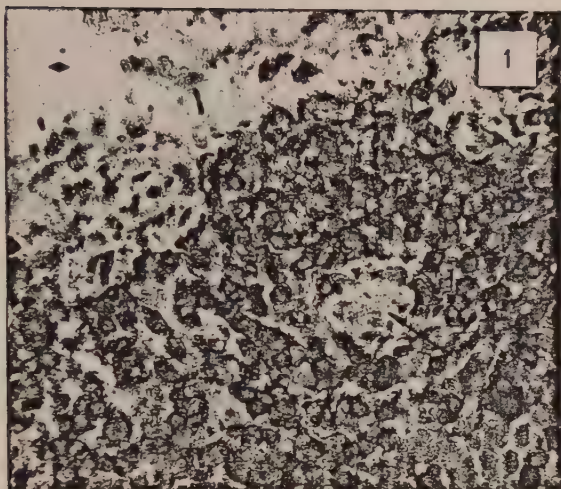


ABB. 1 : Ektopischer Lymphfollikel - Immunperoxidase-Färbung mit MAK T 29/33 (Obj. 40x, Pat. T.E.) in der Subintima der rheumatoiden Synovialis.
(♦ = Gelenkhöhle, — = zentrales Blutgefäß)

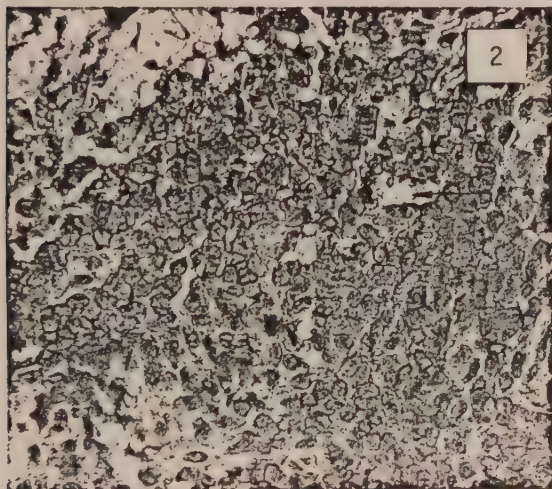


ABB. 2 : Ektopischer Lymphfollikel - IP mit MAK M-T 11.10 (Obj. 40x, Pat. M.I.) : großer T-Zell-Anteil, 11.10*

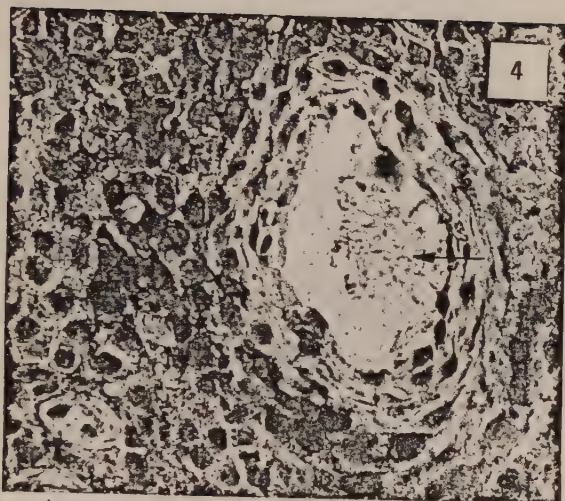


ABB. 4: wie 2, hier IP mit MAK M-T 3.10 (Obj. 100x):
großer T-Helfer-Zell-Anteil, besonders zentral.

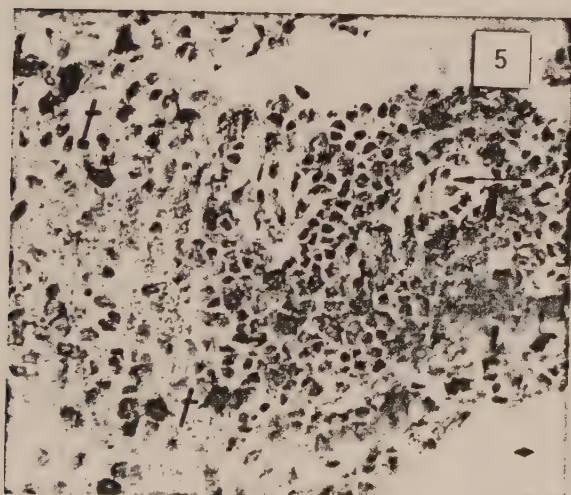


ABB. 5: wie 2, hier IP mit MAK M-T 8.11 (Obj. 25x):
kleiner T-Suppressor-Zell-Anteil, besonders
Follikel-peripher und transitional (+).

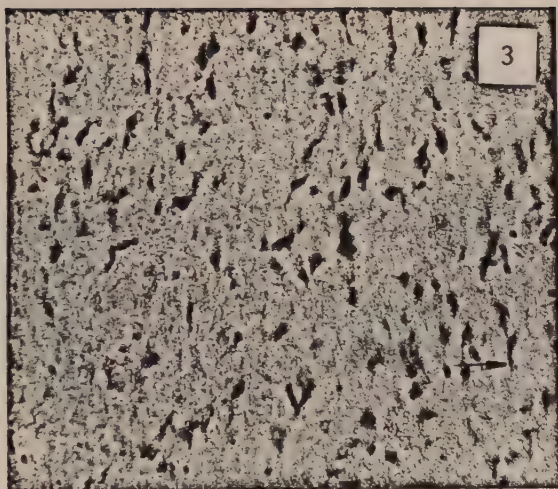


ABB. 3: Interstitielles Areal der synovialen Subintima bei RA. IP mit MAK M-T 11.10, keine positiven Zellen, dendritische Zellformen, — = Zytoplasmaausläufer. (Obj. 40x, Pat. M.I.)

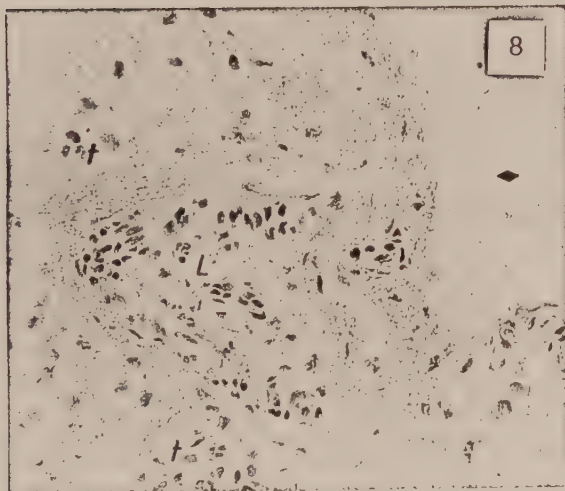
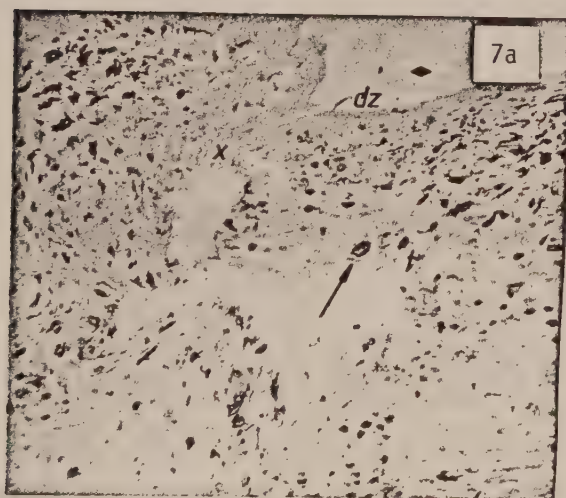


ABB. 8: Synovialis, IP mit MAK 5E2, non-RA, keine positiven Zellen, "lymphozytenreiche" und transitionale Areale (L,t) (◆ = Gelenkhöhle, Obj. 25x, Pat. S.O.)



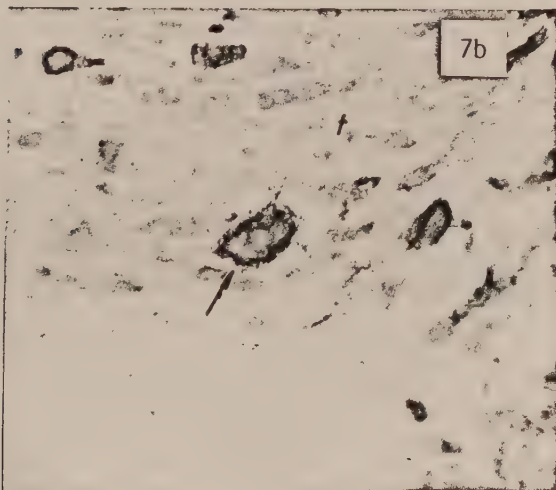
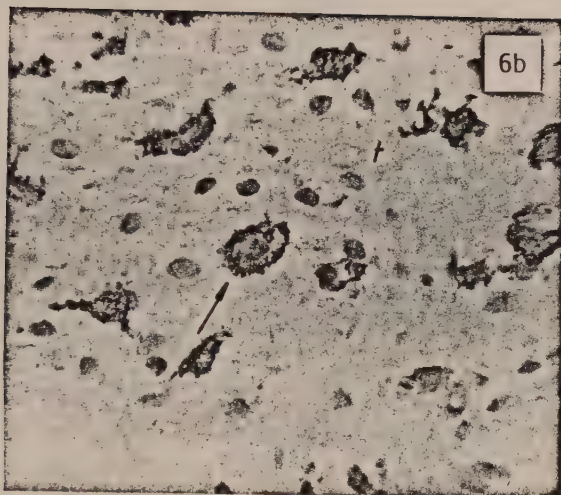


ABB. 6a,b ; 7a,b : Synovialis bei RA, Serienschnitte, IP-Färbung mit MAK 63D3 (6a,b) bzw. SE9 (7a,b). Die Intimalschicht (dz) ist frei von markierten Zellen und in ihrer Kontinuität unterbrochen (x). In den transitionalen Arealen (†) findet sich weitgehende Übereinstimmung SE9- und 63D3-markierter Zellen (→).
 ◆ = Gelenkhöhle, (für 6a, 7a Obj. 10x, für 6b, 7b Obj. 40x, Pat. P.H.)

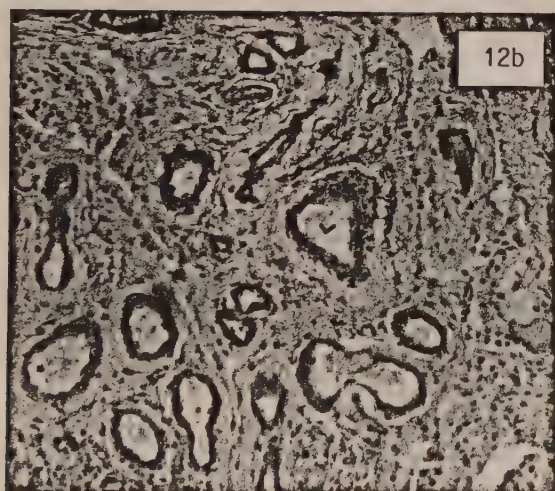
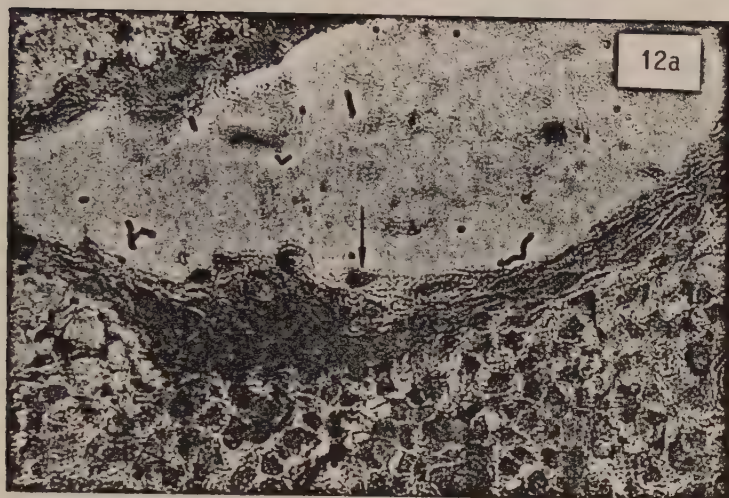


ABB. 12a,b :

Gefäßreiche Subintima bei RA, durch IP-Färbung werden kollagene Strukturen der Gefäßwand dargestellt, wobei die Endothelzellen selbst (→) "ausgespart" bleiben. (verwendeter MAK HB 109, Obj. 100 x, bzw. 10 x, Pat. M.I.)

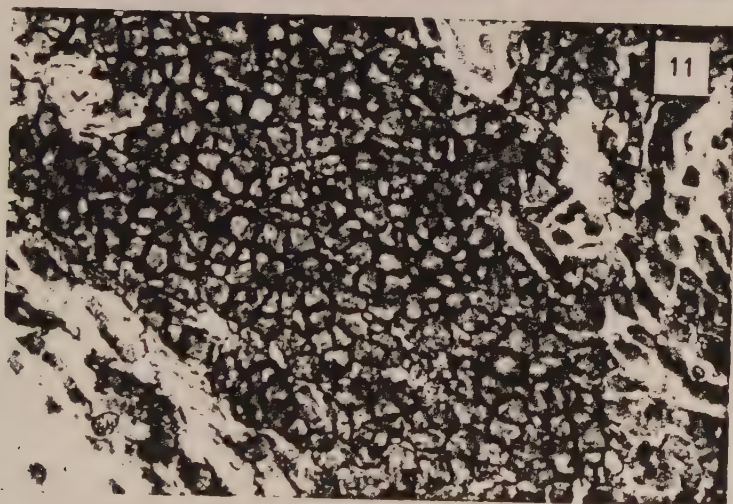
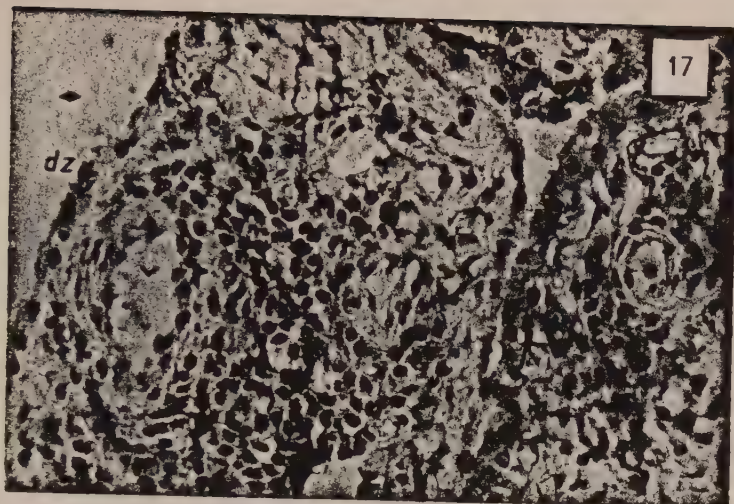


ABB. 17 : Rheumatoide Synovialis, IP mit MAK 5E9, positive Zellen vornehmlich transitional (t), Lymphfollikel und Deckzellen (dz) nur zu kleinen Teilen positiv. (vgl. ABB. 9,10 , Obj. 40 x, Pat. M.I.)

ABB. 11 : wie 17, hier IP mit MAK Tü 22, nahezu vollständig HLA-DQ-positiver synovialer Lymphfollikel bei RA, vgl. ABB. 10 (Obj. 100 x, Pat. M.I., ◄ = Gelenkhöhle, ▼ = zentrales Blutgefäß).

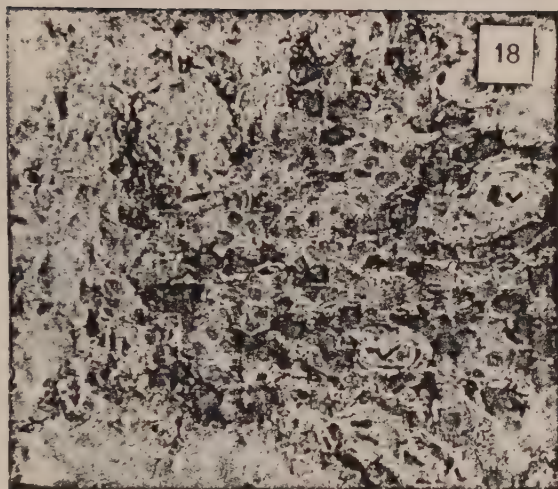


ABB. 18 :

Synoviale Subintima bei RA, IP mit MAK R1A1 :
positive Zellen in einem lymphozytenreichen Areal,
(Obj. 40x, Pat. T.E.)

♥ = Gefäßlumen

3.1.3 Expression von MHC - Klasse II - Antigenen im Synovialgewebe

Mit dem MAK L243 (s. 2.3.8) und L227 (s. 2.3.9) ließ sich in allen Fällen von RA und traumatischer bzw. arthrotischer Gelenkläsion eine große Zahl infiltrierender Zellen markieren. Dieses Ergebnis mit monomorphen HLA-DR - Antigenmarkern steht im Einklang mit früheren Untersuchungen (23, FØRRE et al., 1982).

DR-positive Zellen fanden sich vornehmlich in den lymphozytenreichen Arealen (11 Fälle von RA (73 %) stark positiv, 4 Fälle (27 %) mäßig positiv mit L243, vgl. Abb. 10).

Aber auch die transitionalen Areale wiesen einen großen Teil DR-positiver Zellen auf: hier enthielten bei RA drei Gewebeproben (20 %) mehr als 40 % L243⁺Zellen. Für den MAK L227 ergab sich im transitionalen Areal sogar in 6 Fällen (50 %) von RA starke und in 6 Fällen (50 %) mäßige Infiltration mit L227⁺. Drei RA-Gewebeproben wurden nicht mit L227 getestet. Bei den Nichtrheumatikern war die Gesamtzahl mononukleärer Infiltratzellen niedriger, der Anteil DR-positiver Zellen am Infiltrat war aber, besonders im lymphozytenreichen Areal auch hier relativ hoch (vgl. Tabelle III). Weder in der transitionalen, noch in der interstitiellen Region waren für HLA-DR qualitativ signifikante Unterschiede zwischen RA- und non-RA-Gruppe festzustellen.

Die quantitative Untersuchung der DR-Expression im Synovialgewebe wird unter 3.2 beschrieben. In den fibroblastenreichen interstitiellen Arealen fand sich bei 12 RA-Patienten (80 %) mäßige L243-Positivität, nur in drei Fällen (20 %) von RA ließen sich hier keine L243⁺Zellen nachweisen.

Mit L227 ergab sich ein analoges Ergebnis. Intraindividuell wurde jedoch in vier Fällen (zwei RA, zwei non-RA) keine Übereinstimmung von L243- und L227-Reaktivität im interstitiellen Areal festgestellt (ein Fall: L243⁺, L227⁻; drei Fälle L243⁻, L227⁺).

Dieser, zwar geringfügige, Unterschied läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß die MAK L243 und L227 zwar beide monomorphe HLA-Determinanten erkennen, in den erkannten Epitopen jedoch differieren (vgl. 2.3.8 - 9). Die Verteilung polymorpher DR-Antigene auf Zellen der Synovialis wird unter 3.3 im Zusammenhang mit ihrer Expression auf peripheren Blutleukozyten (PBL) beschrieben. In der vorliegenden Studie wurden die MAK 16.23 (s. 2.3.12, polymorph, "DR 3-like") und R3E11 (s. 2.3.11, polymorph, "DRw52-like") zur Markierung polymorpher HLA-DR-Antigene im Synovialgewebe verwendet.

Ein monomorphes HLA-DQ-Molekül vom MG 46.000 Daltons wird durch den MAK Tü22 (s.2.3.10) erkannt. Sieben RA-Gewebsproben wurden mit Tü22 untersucht. Davon waren in den Lymphfollikeln 5 Fälle (71 %) stark Tü22⁺, ein Fall (14 %) mäßig Tü22⁺ und ein Fall Tü22⁻ (s. Abb. 11).

Auch in den makrophagenreichen transitionalen Regionen war das von Tü22 erkannte Antigen bei RA in 6 von 7 Fällen exprimiert.

Interstitiell fand sich nur ein Fall mit (wenigen) Tü22 - positiven Zellen (s. Tabelle III).

Zur Markierung polymorpher HLA - Klasse II - Antigene aus der DQ-Gruppe wurden die MAK HB 109, Genox3.53 (beide polymorph, DQw1-spezifisch, "class-switch"-Varianten, s. 2.3.13-14), R1A1 (polymorph, "DQw1-like"), S1G10 (polymorph, "DQw1-like", Epitop S1G10 $\neq$ R1A1, s. 2.3.15 - 16) eingesetzt. Die Ergebnisse mit HB 109 und Genox3.53 waren grundsätzlich gleich, wenn auch Genox3.53 meist eine etwas intensivere Peroxidasefärbung verursachte.

Diese Übereinstimmung von HB 109 und Genox3.53 erklärt sich daraus, daß beide MAK an dasselbe Molekül binden und sich nur im Antikörper - Isotyp unterscheiden: HB109 ist ein IgG_{2a}, Genox3.53 ein IgG₁.

Bei RA fanden sich hiermit in zwei Fällen viele, in 6 Fällen

wenige und in 7 Fällen keine DQw1-positiven Zellen in den Lymphfollikeln. In fünf dieser Fälle waren zudem (wenige) Genox 3.53-positive Zellen im transitionalen Areal zu sehen.

Die fibroblastenreichen Regionen blieben immer unmarkiert bei IP-Färbung mit Genox 3.53 bzw. HB109.

Bei den Nichtrheumatikern waren nur in einem Fall (25 %) wenige DQw1⁺Rundzellen in den lymphozytenreichen Bezirken nachweisbar. Transitional und interstitiell imponierten hier keinerlei Genox 3.53-positive Zellen.

Auffällig war, daß sich bei allen untersuchten Gewebeproben (RA und non-RA) die Gefäßwände der kleinen synovialen Venolen und Arteriolen bei IP-Färbung mit Genox 3.53 besonders darstellten: der MAK (Genox 3.53, HB109) band hier an kollagene oder elastische Strukturen in der Gefäßmedia und -Adventitia (s. Abb. 12). Auch die Gefäßintima war zum Teil mit dargestellt, wobei die Endothelzellen jedoch "ausgespart" blieben.

Dieser Nebeneffekt der Peroxidasefärbung mit Genox 3.53 (bzw. HB109) war bei Serienschnitten oftmals hilfreich zur Lokalisations - Orientierung und um Venolen von Lymphgefäßen und schnittbedingten Artefakten zu unterscheiden.

Die MAK R1A1 und S1G10 zeigten, mit einer Ausnahme, das-selbe Bindungsmuster in der rheumatoiden Synovialis:

R1A1 markierte mäßig viele Zellen in den Lymphfollikeln bei 8 RA-Patienten (53 %, S1G10 bei 7 RA-Patienten).

Ebenfalls bei 8 Rheumatikern (53 %, für S1G10 bei 7 RA-Patienten) fanden sich für R1A1 positive Zellen im markophagenreichen Bezirk der Synovialis, in zwei Fällen sogar mehr als 40 %.

Die interstitiellen Areale waren frei von R1A1 - bzw. S1G10-positiven Zellen.

Bei den non-RA-Patienten lagen nur in einem Fall (25 %), welcher auch DQw1⁺ war (vgl. oben), einige wenige R1A1⁺ und S1G10⁺Zellen im lymphozytenreichen Areal vor (s.Tab.III). Dies bedeutet, daß HLA-DQ-Moleküle auf Zellen des entzündlichen Infiltrats bei RA zu einem gewissen Grad stärker exprimiert werden, als in der Synovialis bei Nichtrheumatikern. Die Aussagekraft der Untersuchung polymorpher HLA-Antigene allein in der Synovialis ist jedoch begrenzt. Durch intraindividuellen Vergleich der Expression von polymorphen HLA-Antigenen auf stimulierten PBL und auf Zellen der rheumatoiden Synovialis (s. 3.3.) wird dem Rechnung getragen.

3.2 Expression von Makrophagen-Transferrinrezeptor- und HLA-DR-Antigenen auf Zellen der Synovialis - quantitative Untersuchung

Die unter 3.1 beschriebene weitgehende Übereinstimmung der 63D3⁺ und 5E9⁺Zellen, vor allem in makrophagenreichen Bezirken der Synovialis (vgl. Abb. 6, 7) gab Anlaß zur quantitativen Untersuchung der Expression dieser Antigene. Das vom MAK 5E9 erkannte Antigen, ein 90.000 - Dalton - Glykoprotein (vgl. 2.3.7) wird auf proliferierenden Zellen unterschiedlicher Herkunft exprimiert. 5E9 ist damit ein möglicher Marker der Zellaktivierung beim Menschen (34, HAYNES et al., 1981).

Auch die Korrelation von Makrophagen (63D3⁺), HLA-DR (L243⁺) - und Transferrinrezeptor (5E9⁺) - Expression wurde in definierten Arealen der Synovialis untersucht.

Die Auswertung erfolgte jeweils durch Zählung von 5 "high power fields" (HPF, vgl. 2.4.1) bei insgesamt 13 Patienten mit RA (12 ♀, 1 ♂) und 6 non-RA-Patienten (1 ♀, 5 ♂). Die Ergebnisse sind in Absolut- bzw. Prozentwerten in Tabelle V bzw. VI zusammengefaßt. Die errechneten Mittelwerte ([±] SD) sind aus dem Balkendiagramm in Abb. 13 zu ersehen. Auf der Abszisse sind hier die einzelnen MAK im

jeweiligen Areal benannt, auf der Ordinate die Prozentzahlen für die positiven Infiltratzellen.

Im Vergleich RA/non-RA zeigt sich kaum ein signifikanter Unterschied in beiden Gruppen, was die Expression der HLA-DR (L243) und Makrophagenantigene (63D3) in den einzelnen Arealen betrifft.

Transferrinrezeptor-positive Zellen sind jedoch bei RA (schwarze Balken) im transitionalen Areal im Vergleich zu non-RA (weiße Balken) signifikant vermehrt (Student-t-Test, vgl. Abb. 13).

Die Zahl an Transferrinrezeptor-exprimierenden Zellen erreicht hier nahezu die Zahl an Monozyten/Makrophagen (63D3⁺). Aufgrund der weitgehenden Übereinstimmung von 5E9- und 63D3-positiven Zellen in Serienschnitten kann damit auf eine starke Proliferation von Monozyten/Makrophagen im transitionalen Areal der rheumatoiden Synovialis geschlossen werden. In den Diagrammen 1 - 3 (Abb. 14) ist die intraindividuelle Korrelation der 5E9- und 63D3-positiven Zellen dargestellt. Eine statistische Regressionsanalyse ergab durchweg Werte, die für eine positive Korrelation von 5E9⁺ und 63D3⁺Zellen sprachen. Überraschenderweise war der Zusammenhang zwischen beiden Zellgruppen nominell am höchsten ($r = 0.86$) in den Lymphfollikeln, obwohl die Serienschnitte ein "Überlappen" von 5E9⁺ und 63D3⁺Zellen am deutlichsten in den makrophagenreichen Arealen zeigten. Dennoch wird die allgemein positive Korrelation von 5E9⁺ und 63D3⁺Zellen als weiterer Hinweis dafür gewertet, daß ein großer Teil der Transferrinrezeptor-positiven Zellen der Gruppe der Monozyten/Makrophagen zugeordnet werden kann.

Die für die interstitielle Areale errechneten r -Werte sind tendentiell falsch positiv, da hier beim Gros der Fälle nur eine Infiltration mit sehr wenigen ($< 10\%$) positiven Zellen vorlag. Ebenso schwierig zu bewerten ist die Regressionsanalyse für die non-RA-Gruppe, da hier die Anzahl der Stichproben sehr klein ist ($n \leq 6$).

Die r-Werte für diese Fälle wurden der Vollständigkeit halber mit angegeben.

Andere Autoren (18, DREHER, 1983) haben bereits, unter Verwendung anderer MAK (OKI a1, M-M 5.22), eine Korrelation HLA-DR-positiver Zellen und Makrophagen (M-M 5.22⁺) in der Intimalschicht der Synovialis beschrieben, allerdings ohne Angabe der zugehörigen Korrelationskoeffizienten.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Korrelation von Klasse II-exprimierenden (L243⁺)- und makrophagenähnlichen (63D3⁺) Zellen in der Subintima der Synovialis geht aus den Diagrammen 4 - 6 (vgl. Abb. 15) hervor.

Für das lymphozytenreiche Areal ergab sich ein $r = 0.2$, für die transitionale Region ein $r = 0.45$ (und interstitiell ein $r = 0.84$). Somit ist in den Lymphfollikeln ein Zusammenhang zwischen MHC-Klasse II - Expression und Makrophagen (63D3⁺) sehr unwahrscheinlich.

Dies deckt sich mit den anhand von Serienschnitten erhobenen Befunden: in den Lymphfollikeln exprimierten zumeist sehr viele Zellen HLA-DR (L243⁺) (oft "überlappend" mit den M-T 11.10⁺T-Lymphozyten !) und nur wenige Zellen 63D3⁺ (vgl. Abb. 2, 9, 10).

Ein Zusammenhang zwischen Klasse II-exprimierenden (L243⁺)- und makrophagenähnlichen (63D3⁺) Zellen in den makrophagenreichen Arealen der synovialen Subintima ist bei einem $r = 0.45$ zumindest wahrscheinlich.

Die Befunde aus den Serienschnitten (häufige DR-Positivität großer, 63D3⁺Zellen) sprechen letztlich für eine Zugehörigkeit der Klasse II-exprimierenden transitionalen Zellen zum Monozyten/Makrophagensystem.

Die durchweg starke synoviale HLA-DR-Expression bei RA ist also in den follikulären Arealen vornehmlich ein Zeichen der T-Lymphozyten; in den transitionalen Arealen dagegen ist die DR-Expression hauptsächlich an Monozyten/Makrophagen gebunden.

Beim Vergleich der intraindividuellen Expression von Transferrinrezeptor (5E9⁺)- und HLA-DR-Antigenen bei RA zeigt sich wiederum ein Unterschied für die lymphozytenreichen (follikulären) und makrophagenreichen (transitionalen) Areale (s. Diagramm 7 und 8, Abb. 16). Für 5E9⁺ und L243⁺Zellen ergab sich in den Lymphfollikeln ein $r = -0.076$, in den transitionalen Arealen ein $r = 0.48$. Unter Berücksichtigung der Befunde aus Serienschnitten (Abb. 10, 17) läßt sich hiermit folgende Aussage machen:

Im RA-Lymphfollikel besteht kein Zusammenhang zwischen 5E9⁺ und L243⁺Zellen ($r = -0.076$; $t = -4.73$). Die hier markierten Transferrinrezeptor-positiven Zellen korrelieren eher mit den Monozyten/Makrophagen (63D3⁺, $r = 0.86$), die DR-positiven Zellen sind hier größtenteils den T-Lymphozyten zuzuordnen (Serienschnitte, vgl. Abb. 2, 10; im Follikel keine Korrelation DR⁺/63D3⁺ : $r = -0.2$).

In den transitionalen Arealen der rheumatoiden Subintima ist eine positive Korrelation ($r = 0.48$; $t = -0.83$) von 5E9⁺ und L243⁺Infiltratzellen festzustellen. Zudem "überlappen" sich hier, wie oben beschrieben, 5E9- und L243-positiv makrophagenähnliche Zellen bei Betrachtung von Serienschnitten.

Aus Diagramm 8 wird noch ein weiterer Zusammenhang ersichtlich:

Bei allen Fällen mit geringer Infiltration von Zellen, die den Transferrinrezeptor tragen, fand sich ein größerer Prozentsatz L243-positiver, d. h. HLA-DR-exprimierender Zellen.

In den Fällen mit starker Expression des Transferrinrezeptors auf infiltrierenden Zellen, sahen wir jeweils weniger MHC-Klasse II-Antigen exprimierende Zellen.

Während also in den lymphozytenreichen Regionen der rheumatoiden (und non-RA !) Synovialis (subintimal) die Zahl der DR⁺Zellen bei weitem überwiegt, lassen sich in den transitionalen Arealen zwei Typen der Infiltration unterscheiden

Bei einem Teil der Patienten (5 Fälle, ausschließlich RA) überwiegt hier im Infiltrat die Transferrinrezeptor-Expression, bei dem anderen Teil (8 Fälle RA, 5 non-RA) finden sich mehr Klasse II-positive als Transferrinrezeptor-exprimierende Zellen im Infiltrat.

Daraus auf eine jeweils unterschiedliche lokale Immunaktivierung zu schließen, wäre spekulativ; auffällig ist jedoch, daß der Typ überwiegender 5E9⁺Infiltration im transitionalen Areal der synovialen Subintima nur bei RA und nicht bei traumatischer oder arthrotischer Gelenksläsion gefunden wurde.

TABELLE V.VI: Quantitative Untersuchung: 6303-, L243- und SE9- positive Infiltratzellen in der Synovialis (subintimal) bei RA und non-RA

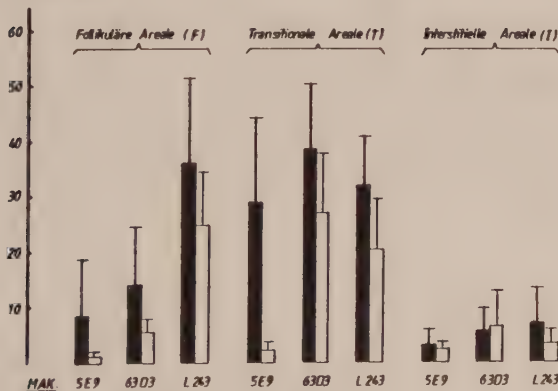
MAK	5E9	6303	L 243						
AREAL	L-FOLLIKEL TRANSITIONELLE INTERSTITIELL	FOLLIKULÄRE TRANSITIONELLE INTERSTITIELL	FOLLIKULÄRE TRANSITIONELLE INTERSTITIELL						
subint. 1/100 (%)									
P. H.	39/276 = 14%	72/756 = 9,5%	1/100 = 0%	65/236 = 28%	57/706 = 8,1%	9/130 = 6,9%	42/732 = 5,7%	11/120 = 9%	
K. Ld.	26/302 = 9%	79/713 = 11,1%	8/130 = 6%	75/349 = 21%	69/703 = 9,8%	70/121 = 5,8%	29/254 = 11%	62/753 = 8,2%	24/306 = 7,8%
H. T.	40/235 = 17%	67/783 = 8,6%	8/130 = 6%	25/277 = 9%	62/751 = 8,3%	7/118 = 6%	62/726 = 8,5%	54/757 = 7,1%	3/100 = 3%
M. R.	95/253 = 37%	79/773 = 10,2%	20/116 = 17%	95/226 = 42%	10/79 = 13%	24/706 = 3,4%	77/255 = 30%	50/779 = 6,4%	20/779 = 2,6%
B. E.	71/244 = 29%	40/783 = 5,1%	4/175 = 2%	33/249 = 13%	50/751 = 6,7%	18/143 = 12%	44/276 = 16%	63/771 = 8,2%	14/771 = 1,8%
M. M.	12/305 = 4%	27/783 = 3,4%	0/107 = 0%	20/282 = 7%	44/773 = 5,7%	2/771 = 0,3%	63/254 = 25%	44/751 = 5,9%	10/722 = 1,4%
K. E.	71/788 = 9%	13/713 = 1,8%	0/115 = 0%	14/247 = 6%	32/722 = 4,4%	1/771 = 0,1%	33/706 = 4,7%	27/788 = 3,4%	1/83 = 0,1%
K. I.	31/235 = 13%	57/671 = 8,5%	8/130 = 6%	22/277 = 8%	54/773 = 7,1%	7/722 = 1%	67/204 = 33%	67/771 = 8,7%	13/771 = 1,7%
M. I.	61/406 = 15%	22/726 = 3%	0/170 = 0%	14/383 = 4%	10/723 = 1,4%	2/742 = 0,3%	30/406 = 7,4%	59/223 = 26%	4/742 = 0,5%
A. A.1	51/235 = 22%	62/754 = 8,2%	0/120 = 0%	14/233 = 6%	65/751 = 8,7%	0/105 = 0%	47/706 = 6,7%	49/747 = 6,6%	0/744 = 0%
S. M.1	41/308 = 13%	12/779 = 1,5%	0/125 = 0%	22/267 = 8%	34/771 = 4,4%	0/114 = 0%	104/23 = 45%	25/781 = 3,2%	1/729 = 0,1%
E. E.1	91/277 = 33%	41/416 = 10%	0/175 = 0%	37/255 = 15%	30/751 = 4%	2/115 = 2%	71/227 = 31%	48/416 = 11%	3/111 = 3%
T. E.1	61/302 = 20%	38/771 = 5%	0/172 = 0%	42/384 = 11%	67/723 = 9,3%	0/783 = 0%	18/706 = 2,6%	76/771 = 9,9%	3/783 = 0,4%
G. J.1	21/273 = 8%	1/772 = 0,1%	0/97 = 0%	21/229 = 9%	51/770 = 6,6%	1/197 = 0,5%	41/781 = 5,3%	71/773 = 9,2%	0/778 = 0%
L. A.1	41/250 = 16%	7/745 = 1%	2/178 = 1%	20/251 = 8%	50/779 = 6,4%	7/138 = 5%	50/723 = 6,9%	34/754 = 4,5%	2/132 = 0,3%
W. D.1	61/290 = 21%	6/750 = 0,8%	13/770 = 1,7%	71/215 = 33%	47/751 = 6,3%	22/771 = 2,9%	75/706 = 10,6%	34/771 = 4,4%	10/706 = 1,4%
W. S.1	X	0/781 = 0%	0/770 = 0%	X	22/765 = 2,9%	1/783 = 0,1%	X	29/779 = 3,7%	2/771 = 0,3%
P. K. 61	0/165 = 0%	4/743 = 0,5%	0/775 = 0%	20/273 = 7%	50/746 = 6,7%	4/706 = 0,6%	nd	nd	nd
M. W. 61	0/270 = 0%	0/779 = 0%	0/775 = 0%	9/785 = 1,1%	39/773 = 5,1%	6/706 = 0,8%	20/779 = 2,6%	34/703 = 4,9%	3/704 = 0,4%

Symbole: 1) Absolutwerte, Anzahl der markierten (IP) Zellen in 5 Gesichtsfeldern (HFF) / Anzahl der Infiltratzellen in 5 HFF, 2) Relativwerte zu 1) 3) Je nach positiver RA (subint., int.), seronegative RA, Coarthritis, variiertes Nucleusstratum; X = hier keine lymphozytenreichen Areale vorhanden; nd = nicht bestimmt.

ABB. 13 : HÄUFIGKEIT 6303-, L243- UND 5E9-POSITIVER INFILTRATZELLEN IN DER SYNOVIALIS (subintimal). -MITTELWERTE

	RA (n=13)	non-RA (n=6)
	% positive Zellen, $\bar{x}$	% positive Zellen, $\bar{x}$
<u>LYMPHOFLUTEL:</u>		
SE9	0,0	1,0
6303	14,3	5,4
L 243	36,2	24,5
<u>TRANSITIONAL:</u>		
SE9	28,9	2,3
6303	38,5	24,3
L 243	32,2	20,4
<u>INTERSTITIELL:</u>		
SE9	2,0	2,3
6303	5,4	6,7
L 243	7,7	3,2

% positive Zellen



Symbole dunkle Balken = RA, helle Balken = non-RA

Student-t-Test:

- für SE9

in (F) $n=17, p=16, t=1,639 \rightarrow |t| < t_{\alpha}, F_{RA} = F_{non-RA}$
 in (T) $n=18, p=7, t=3,923 \rightarrow |t| > t_{\alpha}, d.h. SE9^+ \text{ bei RA}$
 in (I) $n=17, p=16, t=0,000 \rightarrow |t| < t_{\alpha}, F_{RA} = F_{non-RA}$

$t_{\alpha} = 2,673$ bei Signifikanzniveau $\alpha = 0,025$ und $k=16$

- für L243

in (F) $n=16, p=15, t=1,248 \rightarrow |t| < t_{\alpha}, F_{RA} = F_{non-RA}$
 in (T) $n=17, p=16, t=2,261 \rightarrow |t| > t_{\alpha}, F_{RA} = F_{non-RA}$

KORRELATION DER 5E9- UND DER 63D3-POSITIVEN INFILTRATZELLEN (subintimal)

Diagramm 1:

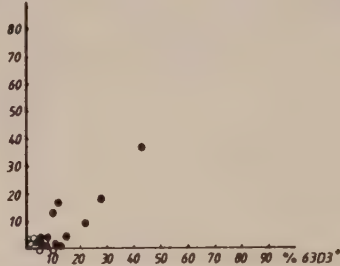
- FOLLIKULARE AREALE

Korrelationsanalyse

RA (n=13): $A = 6,58$
 $B = 0,88$
 $r = 0,88$

non-RA (n=5): $A = 6,4$
 $B = -1$
 $r = -0,27$

% 5E9°



Symbole:

● = RA-Pat.

○ = non-RA-Pat

Diagramm 2:

- TRANSITIONALE AREALE

RA (n=13): $A = 26,78$
 $B = 0,43$
 $r = 0,55$

non-RA (n=6): $A = 5,46$
 $B = 4,96$
 $r = 0,72$

% 5E9°

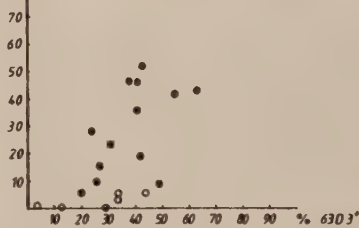


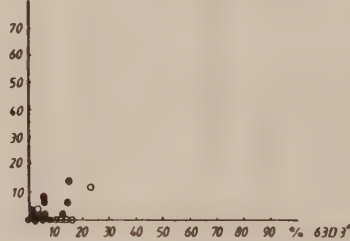
Diagramm 3:

- INTERSTITIELLE AREALE

RA (n=13): $A = 2,95$
 $B = 0,88$
 $r = 0,88$

non-RA (n=6): $A = 2,77$
 $B = 1,67$
 $r = 0,27$

% 5E9°



KORRELATION DER L 243- UND DER 63D3-POSITIVEN INFILTRATZELLEN (subintimal)

Diagramm 4:

% L 243°

- FOLLIKULÄRE AREALE

Symbole: ● = RA-Pat.
○ = non-RA-Pat

Korrelationsanalyse:

RA(n=13): $A = 18,75$
 $B = -0,12$
 $r = -0,2$

non-RA
(n=4): $A = 5,50$
 $B = -0,05$
 $r = -0,2$

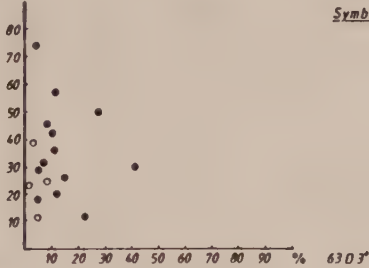


Diagramm 5:

% L 243°

- TRANSITIONALE AREALE

RA(n=13): $A = 19,41$
 $B = 0,59$
 $r = 0,43$

non-RA
(n=5): $A = 2,36$
 $B = 1,10$
 $r = 0,76$

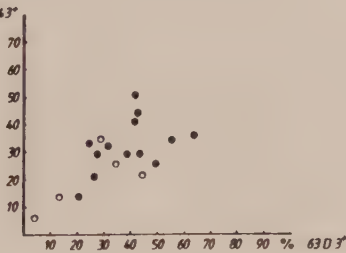


Diagramm 6:

% L 243°

- INTERSTITIELLE AREALE

RA(n=13): $A = 37,20$
 $B = -0,13$
 $r = 0,84$

non-RA
(n=5): $A = -1,13$
 $B = 2,40$
 $r = 0,77$

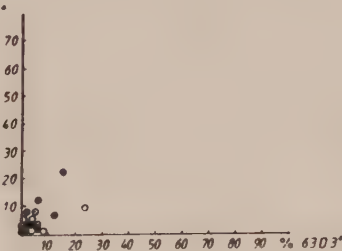
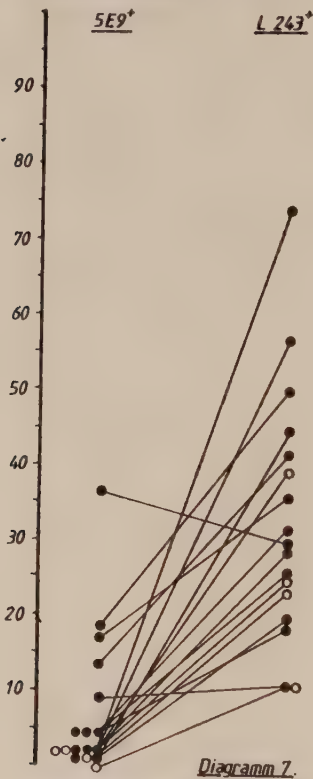


ABB. 16: EXPRESSION VON HLA-DR- UND TRANSFERRINRECEPTOR-ANTIGEN AUF INFILTRATZELLEN DER SYNOVIALIS BEI RA.

a. LYMPHFOLL IKEL (T-Zell-reich)

b. TRANSITIONALE AREALE (M)

% positive Zellen



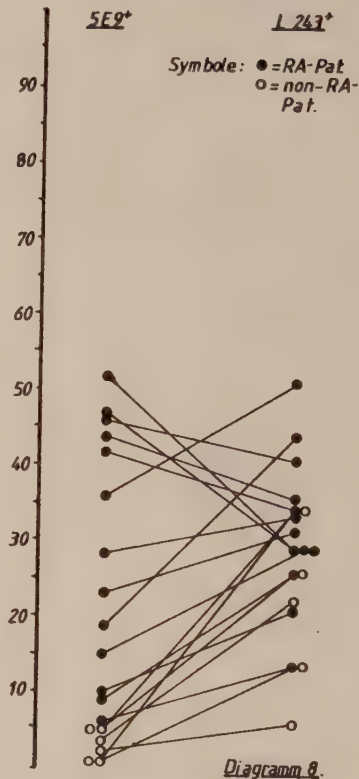
Regressionsanalyse:

RA (n=13): $A = 37,28$ $B = -0,13$ $r = -0,076$

Student-t-Test:

RA (n=13, p=12): $t = -4,730$

kein Zusammenhang für $\alpha = 0,025, |t| > t_{\alpha}$



Symbole: ● = RA-Pat
○ = non-RA-Pat.

RA (n=13): $A = 23,96$ $B = 0,29$ $r = 0,48$

RA (n=13, p=12): $t = -0,831$

Gleichheit, da $|t| < t_{\alpha}$ ($t_{\alpha} = 2,391$)

3.3 Gewebsspezifische Expression von MHC - Klasse II - Antigenen

Zum Nachweis einer möglichen Gewebsspezifität der HLA - Klasse II - Expression wurden stimulierte PBL und Synovialis unter Verwendung derselben MAK vergleichend untersucht.

3.3.1 Single - Cell - ELISA (SCE)

Die Ergebnisse des mit sogenannten PHA - Blasten durchgeführten Single - Cell - ELISA sind in Tabelle VII dargestellt.

Es wurden Testzellen von 15 Patienten mit RA (10 ♀, 5 ♂) und von einer Patientin mit Coxarthrose untersucht (Methode s. 2.4.2).

Alle PHA-stimulierten Zellen waren mit MAK MPC 11 areaktiv, das heißt die Negativkontrolle war gewährleistet (MPC 11 ist ein IgG_{2b} ohne bekannte Spezifität, vgl. Tab. II). Auch die Positivkontrolle mit HB 28 (β_2 -Mikroglobulin - spezifisch, s. Tab. II) wurde in allen Fällen erfüllt. Die PHA - Blasten sämtlicher Patienten (RA und non-RA) exprimierten monomorphe HLA - Klasse I-(w6/32⁺) und Klasse II - Antigene (L243⁺, L227⁺).

Für die polymorphen HLA-Klasse I - Antigene zeigte sich eine geringere Repräsentation auf den PBL: ME-1 war positiv in 9 (60 %), HB59 in 5 (33 %) und BB7.1 in 7 Fällen (47 %).

Die von diesen MAK erkannten Antigene HLA-B7, B27, B22 und B60 (vgl. Tab. II) sind im untersuchten RA-Kollektiv demnach heterogen verteilt. Bei Positivität der Testzellen mit MAK BB7.1 ist, mit einer Ausnahme, die "breitere" Spezifität ME-1 immer auch exprimiert.

Besonders bei Patienten mit s e r o n e g a t i v e r RA (kein IgM-RF) fanden sich die Antigene HLA-B7, B27, B22 und B60:

ME-1⁺ (B7, B22, B27) waren 86 % der seronegativen (6 von 7),
aber nur 38 % der seropositiven RA-Patienten
(3 von 8),

HB59⁺ (B7, B60) waren 57 % der seronegativen (4 von 7),
aber nur 13 % der seropositiven RA-Patienten
(1 von 8).

Die hier untersuchten polymorphen HLA - Klasse II - Antigene waren auf den PBL von RA-Patienten wie folgt repräsentiert:

Das vom MAK R3E11 erkannte Antigen (DRw52) war bei 5 RA-Patienten (33 %) auf PHA-Blasten exprimiert, das durch 16.23 charakterisierte Molekül ("DR3-like") bei einer RA-Patientin (7 %). Häufiger fand sich das DQw1 - Antigen (HB109⁺, Genox 3.53⁺), nämlich bei 8 der untersuchten RA-Patienten (53 %).

Tabelle VII: SINGLE - CELL - ELISA (SCE) - Ergebnisse.

Patient ¹	HAK ⁴ MOR 71 HB 20 L 263 L 227 2.06	Spezifität										HLA - Klasse II										HLA - Klasse I									
		RE 71	S 7 F 4	S 2	S 2 B 6	W 23	Gen 23	HB 09	RI 41	S 1010	W 6132	ME 1	HB 59	EB 71																	
M. R.	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
B. E.	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
M. M.	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
K. E.	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
K. I.	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
M. I.	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
N. I.	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
R. M.	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
A. A ²	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
S. J ²	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
S. M ²	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
E. E ²	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
T. E ²	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
G. S ²	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
R. J ²	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
G. J ³	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o

1	aeroplasmische RA (Antib ²⁻³), 2	seronegative RA, 3	Granulomatose, 4	HAK = monoklonaler Antikörper, vgl. Tab. II
o	= mehr als 5% der Testzellen positiv			
+	= weniger			
o	= keine			

Stichprobe

¹ seropositive RA (außer ^{2,3}), ² seronegative RA, ³ Lowtiterose, ⁴ HAK = monoklonaler Antikörper, vgl. Tab. II

o = mehr als 50% der Testzellen positiv
 o = weniger
 o = keine

Die MAK R1A1 und S1G10 (beide "DQw1-like") markierten rheumatoide PHA-Blasten in drei Fällen. Dabei war einmal DQw1 selbst nicht exprimiert, so daß die untersuchten Zellen den Phänotyp R1A1⁺ HB109⁻ zeigten.

3.3.2 Vergleich der Expression von MHC - Klasse II - Antigenen auf PBL und in der Synovialis

In Tabelle VIII sind die Ergebnisse aus SCE und IP-Färbung der Synovialis zusammengefaßt.

Es wurde deutlich, daß die untersuchten Antigene bei den meisten Fällen im Blut und im Gewebe analog exprimiert werden bzw. jeweils nicht vorliegen.

Für die monomorphen HLA-DR-Antigene (L243, L227) gilt dies uneingeschränkt in allen untersuchten Fällen.

Polymorphe Klasse II - Antigene weisen jedoch in mehreren Fällen von RA unterschiedliche Expression auf Zellen des peripheren Blutes und der Synovialis auf:

So ist das auf PBL gefundene Antigen für die MAK 16.23 (1 Fall), R3E11 (2 Fälle) und Hb109/Genox 3.53 (2 Fälle) auf Zellen der Synovialis nicht nachweisbar. Dieses anscheinend seltene Phänomen wäre durch die artefizielle Stimulation der PBL erklärbar; die synovialen Infiltratzellen exprimieren die betreffenden Antigene nicht in jedem Fall, da sie nicht, wie die PBL, Lektin-stimuliert worden sind.

Überraschenderweise gibt es aber noch eine größere Zahl an Fällen, bei denen die synovialen Infiltratzellen Antigene exprimieren, die auf PHA-stimulierten PBL nicht nachweisbar sind:

R3E11 reagiert in 5 Fällen (1 non-RA !), 16.23 in vier, R1A1 und S1G10 in zwei und HB109/Genox 3.53 in zwei Fällen von RA positiv mit Zellen der Synovialis bei gleichzeitiger Negativität mit PBL (vgl. Tabelle VIII).

Diese gewebspezifische Expression von MHC-Klasse II-Antigenen fand sich in den lymphozytenreichen Arealen und teilweise in den transitionalen Regionen der synovialen Subintima (s. 3.1). Daher wurde in Tabelle VIII die Relation der T-Zell-Subpopulation (T_H/T_S) in der Synovialis mit dargestellt.

In keinem Fall gewebspezifischer DR - Expression (R3E11⁺, 16.23⁺) zeigte sich ein Überwiegen der T-Suppressor-Lymphozyten im entsprechenden synovialen Areal. Hier dominierten immer follikulär bzw. transitional die T-Helfer-Lymphozyten an Zahl.

Bei drei von sechs Fällen ohne synovialis-spezifische Expression polymorpher DR - Antigene war dagegen ein zahlenmäßiges Überwiegen der T-Suppressorzellen in der Synovialis nachweisbar (vgl. Tabelle VIII, Patienten "M.I., AK.A., T.E.").

TAB. VIII : SCE - IP (Intraindividuellet Vergleich)

MAK Pat. ¹	L 243	L 227	16, 23	R3E11	Genoc33	HB 109	R1A1	S1G 10	Überwiegende T-Zell-SP ⁴ in (F) (T)	
M.R.	%	%	%	%	%	%	%	%	◀	○
B.E.	%	%nd	%	⊙/△	%	%	%	%	◀	○
M.M.	%	%	⊙/△	⊙/△	%	%	%	%	◀	◀
K.E.	%	%	%	⊙/△	%	%	⊙/△	⊙/△	◀	○
K.I.	%	%	⊙/△	%	%	%	%	%	○	◀
M.I.	%	%	%	%	%	%	⊙/△	⊙/△	+	○
N.I.	%	%	%	%	%	%	%	%	◀	◀
AA ²	%	%nd	%	%	%	%	%	%	○	+
S.J. ²	%	%	⊙/△	%	%	%	%	%	◀	◀
S.M. ²	%	%	⊙/△	⊙/△	⊙/△	⊙/△	%	%	○	◀
E.E. ²	%	%	%	%	%	%	%	%	○	◀
T.E. ²	%	%	%	%	⊙/△	⊙/△	%	%	○	+
G.J. ³	%	%	%	⊙/△	%	%	%	%	○	◀

SYMBOLE : % ≙ PBL / Synovialgewebe, wobei • ≙ jeweiliges Antigen exprimiert,
 ⊙/△ ≙ gewebsspezifische Expression, ◊ ≙ " " "nicht " "

¹ seropositive RA (außer ^{2,3}), ² seronegative RA, ³ Coxarthrose,

⁴ Subpopulation (T_H, T_S) in der Synovialis, vgl. Tabelle IV

4. Diskussion

4.1 Immunhistologie der Synovialis

Die Ergebnisse zeigen, daß in der rheumatoiden Synovialis eine subintimale Infiltration mit vornehmlich lymphoiden Zellen des T-Zell-Phänotyps vorliegt.

Dies steht im Einklang mit verschiedenen anderen Untersuchungen (32, KLARESKOG, 34, KUROSAKA, 18, DREHER). Da auch in der Synovialis von non-RA-Patienten subintimale T-Zell-Infiltrate nachweisbar waren, ist nicht auf eine RA-Spezifität des T-Zell-Infiltrats zu schließen. Ektopische Lymphfollikel, sogenannte Pseudofollikel wurden zwar nur bei rheumatischer Synovitis beobachtet, scheinen jedoch allein kein Spezifikum der RA zu sein.

Hinsichtlich der bislang unterschiedlich bewerteten (18, DREHER, 23, FORRE) T-Zell-Subpopulationen in der rheumatoiden Synovialis ist folgendes festzustellen:

Morphologisch verschiedene Areale der Synovialis zeigen quantitativ unterschiedliche Dominanz der T-Zell-Subpopulationen (vgl. Tabelle IV).

In den ektopischen Lymphfollikeln herrschen bei RA die T-Helferzellen ($M-T\ 3.10^+$) in mehr als 50 % der Fälle vor, nur in einem Fall überwiegen hier die T-Suppressorzellen zahlenmäßig.

Bei non-RA-Patienten wurde in keinem Fall eine Mehrzahl an T-Helferzellen in Lymphozyten-Anhäufungen beobachtet (wobei sich hier keine typischen Pseudofollikel mit mehr als 100 Lymphozyten fanden).

Bei Betrachtung der transitionalen und interstitiellen Areale der synovialen Subintima läßt sich keine eindeutige numerische Dominanz einer T-Zell-Subpopulation feststellen, weder bei RA, noch bei non-RA.

Bei RA stellen sich interstitiell mehrmals $M-T\ 11.10$ -negative, also phänotypische Nicht-T-Zellen, positiv mit $M-T\ 3.10$ dar.

Dies weist darauf hin, daß der MAK M-T 3.10 hier Strukturen markiert, die nicht auf T-Lymphozyten exprimiert werden. Aufgrund der Morphologie dieser M-T 3.10⁺Zellen und wegen ihrer mikroanatomischen Lage innerhalb der Synovialis ist ihre Zugehörigkeit zum Monozyten/Makrophagensystem nicht unwahrscheinlich.

Diese Beobachtung wurde für T-Helferzell-MAK bereits bei Phänotypisierung verschiedener Gewebearten beschrieben (25, GÖTTLINGER, 1985; 11, CERF-BENSUSSAN, 1983; 61, WOOD, 1983). In jüngster Zeit wird die Eindeutigkeit der alleinigen Bestimmung von T-Zell-Subpopulationen in der Synovialis angezweifelt (38, LINDBLAD, 1985).

Wesentlich homogener stellen sich die Ergebnisse bei Markierung mit monozyten/makrophagenspezifischen MAK dar. Für die MAK 63D3 und LeuM3 ergaben sich durchweg gleiche Ergebnisse (s. 3.1, 3.2):

Der größte Anteil an makrophagenähnlichen Zellen liegt jeweils in den transitionalen Arealen (ca. 40 % positive Zellen bei RA, vgl. Abb. 13).

In den Lymphfollikeln und interstitiell wurden nur wenige Zellen vom Monozyten/Makrophagen-Phänotyp beobachtet (14 % bzw. 6 %).

Bei den non-RA-Patienten zeigte sich eine qualitativ gleiche Zellverteilung mit insgesamt weniger Zellen (transitional ca. 25 % 63D3⁺).

HLA-DR-positive Infiltratzellen fanden sich bei RA in großer Anzahl (40 % bzw. 30 %) in den Lymphfollikeln und transitionalen Regionen, kaum jedoch in den interstitiellen Arealen.

Analoge Ergebnisse für HLA-DR-MAK, auf zahlenmäßig niedrigerem Niveau konnten bei non-RA erzielt werden (vgl. Abb. 13).

Die Befunde aus verschiedenen MAK-Markierungen (63D3, L243, 5E9) von Serienschnitten wurden in einer Regressionsanalyse verglichen:

Die hohe HLA-DR-Aktivität in den Lymphfollikeln ist nicht den Monozyten/Makrophagen allein zuzuschreiben. Hierfür besteht keine signifikante Korrelation. Die DR-positiven Zellen in den Pseudofollikeln waren in anderen Untersuchungen (38, LINDBLAD, 1985; 28, JANOSSY, 1981) den sogenannten dendritischen Zellen zugeordnet worden. Diese Antigen-präsentierenden, nicht phagozytären Zellen sollen in vitro stärkere stimulierende Eigenschaften auf autologe und allogene Responderzellen ausüben als Blutmonozyten (59, WAALEN, 1986).

Die anhand von Serienschnitten erhobenen morphologischen Befunde (vgl. Abb. 2, 10, 11) machen jedoch wahrscheinlich, daß ein großer Teil der HLA-DR-exprimierenden Zellen in den Lymphfollikeln von den T-Zellen selbst gestellt wird.

Diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von LINDBLAD (38, 1985) und unseren Beobachtungen erklärt sich durch die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden:

In der vorliegenden Studie wurden vermehrt morphologische Kriterien berücksichtigt, dort waren in-vitro-Tests an eluierten Zellen durchgeführt worden.

Aus der bisherigen Darstellung kann man schließen, daß in verschiedenen Arealen der rheumatoiden Subintima phänotypisch unterschiedliche Zellgruppen aktiviert sind:

In den Lymphfollikeln dominieren T-Zellen, transitional makrophagenähnliche Zellen.

Zumindest quantitativ ergeben sich für beide Areale unterschiedliche Aktivationswege:

Follikulär besteht kein Zusammenhang zwischen Klasse II-Antigen-tragenden- und Transferrinrezeptor-exprimierenden Zellen, transitional korrelieren beide Parameter (Abb. 16). In diesem Zusammenhang ist die enge Korrelation von makrophagenähnlichen ($63D3^+$, $LeuM3^+$) und Transferrinrezeptor-positiven Zellen bei RA, sowohl in follikulären ($r = 0.86$) als auch in transitionalen ($r = 0.55$) Arealen zu erwähnen.

Die Expression des Transferrinrezeptors zeigt Zell-Aktivierung und -Proliferation an (26, HAYNES, 1981). Bei keiner non-RA-Probe konnte hier eine nennenswerte Transferrinrezeptor-Expression nachgewiesen werden, so daß sich die Transferrinrezeptor-Expression bei RA als signifikant erhöht darstellt (s. Abb. 13).

Die vorliegenden immunhistologischen Ergebnisse erlauben folgende zusammenfassende Feststellungen:

Seropositive und -negative RA weisen in der synovialen Subintima keine signifikanten immunhistochemischen Unterschiede auf.

In der rheumatoiden Synovialis ist die Transferrinrezeptor-Expression im Vergleich zur nicht rheumatoid entzündeten Synovialmembran signifikant erhöht.

Serienschnitte zeigen, daß makrophagenähnliche Zellen der synovialen Subintima das Transferrinrezeptor-Antigen exprimieren. Diese vornehmlich transitional gelegenen Monozyten/Makrophagen sind somit als verstärkt aktiviert anzusehen.

Beim Vergleich der HLA-DR-Expression in der Synovialis von Patienten mit RA und non-RA ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

Da morphologisch unterschiedlich definierte Areale der Synovialis sehr verschiedene Zellzusammensetzung und Antigenexpression aufweisen, kann die Berücksichtigung der Mikroanatomie bei der immunhistologischen Beurteilung des synovialen Zellverbandes entscheidend sein.

Bei der in dieser Studie angewandten Methodik kann die Immunhistochemie diagnostische Hinweise auf das Vorliegen einer RA liefern.

4.2 Single - Cell - ELISA

Mit dieser weiteren Untersuchungsmethode wurden parallel zur Synovialis weiße Blutzellen (PBL) zum Zeitpunkt der Synovektomie auf Expression von MHC-Antigenen untersucht. Die mit Phytohämagglutinin (PHA) stimulierten PBL sollten alle genetisch determinierten HLA-Antigene exprimieren. Davon ausgehend können etwaige Expressionsunterschiede auf PBL und im Synovialgewebe Hinweise auf unterschiedliche Aktivierung beider Zellarten liefern.

Alle untersuchten PBL- bzw. Synovialisproben wiesen (verschieden starke) Expression monomorpher HLA-DR-Antigene auf.

Unterschiede ergaben sich nur für polymorphe HLA-D/DR-Antigene:

Die MAK 16.23 und R3E11 (DR3 + DRw13; DRw52-ähnlich) wurden in jeweils 4 bzw. 5 Fällen (s. Tabelle VIII) gewebsspezifisch exprimiert. In diesen Fällen finden sich vermehrt T-Helferzellen in der Synovialis.

Die gewebsspezifische HLA-DR-Expression ist hier offensichtlich abhängig vom Überwiegen der T-Helferzellen in der Synovialis.

Unter den Fällen, die 16.23 und R3E11 nicht bzw. blut analog exprimierten (6 RA-Patienten, s. Tabelle VIII) finden sich 3 Fälle mit einer Mehrzahl an T-Suppressorzellen in der Synovialis.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß ein Überwiegen synovialer T-Helferzellen bei RA offenbar in Zusammenhang steht mit einer gewebsspezifischen Expression polymorpher HLA-D/DR-Antigene in der Synovialis. Funktionelle Tests sind nötig, um die Art dieses Zusammenhangs zu ergründen und um eventuelle prognostische Aussagen bezüglich der zu erwartenden Progredienz der RA zu ermöglichen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden infiltrierende Zellen der Synovialis und Blutleukozyten immunhistochemisch charakterisiert.

Dies erfolgte vergleichend bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis, mit Gelenkstraumata und mit Coxarthrose.

Wir betrachteten sowohl die Morphologie, als auch die Expression verschiedener Differenzierungs- und Aktivierungsmarker.

Durch intraindividuellen Vergleich (Synovialiszellen/Blutleukozyten) wurde die gewebsspezifische- bzw. analoge Expression von MHC - Antigenen untersucht.

Signifikante RA-spezifische Veränderungen fanden sich nur in den sogenannten transitionalen Arealen der synovialen Subintima.

Hier konnten makrophagenähnliche Zellen nachgewiesen werden, die das Transferrinrezeptor-Antigen exprimieren und somit als vermehrt aktiviert angesehen werden müssen.

Die erhöhte Anzahl aktivierter synovialer Makrophagen korreliert ($r = 0.77$) mit der klinischen Prozeßaktivität nach CHALKINS.

Für einen Teil der untersuchten polymorphen MHC-Klasse II-Antigene fanden wir gewebsspezifische Expression; immer war hierbei eine Vermehrung der T-Helferzellen in der Synovialis zu beobachten.

Als Ergebnis ist festzustellen, daß die Immunhistologie der Synovialis diagnostische Hinweise auf das Vorliegen einer RA liefern kann.

Sowohl aktivierte synoviale Makrophagen als auch die Expression polymorpher MHC - Antigene auf Synovialzellen werden als immunhistochemische Charakteristika der RA weiter zu fokussieren sein.

6. Literaturverzeichnis

- (1) AL-BALAGHI, S., High incidence of spontaneous Ig-
STRÖM, H. and producing Lymphocytes in peripheral
MÖLLER, E.; Blood and Synovial Fluid of Patients
 with active seropositive Rheumatoid
 Arthritis
 Scand. J. Immunol. 16, 69-76 (1982)

- (2) BANKHURST, A.D., Predominance of T-cells in the
HUSBY, G. and lymphocytic infiltrates of Synovial
R.C. WILLIAMS JR.; tissues in rheumatoid arthritis
 Arthr. & Rheumatism 19, 555 (1976)

- (3) BARNSTABLE, C.J., Production of monoclonal antibodies
BODMER, W.F., to group A erythrocytes, HLA and
BRON, G., other human cell surface antigens.
GALFRE, G., New tools for genetic analysis
MILSTEIN, C., Cell 14, 9 (1978)
WILLIAMS, A.F. and
ZIEGLER, A.;

- (4) BELL, D.A. and Distribution of activated B-Lympho-
PINTO, J.; cytes in the Circulation and Syno-
 vial Fluid in Rheumatoid Arthritis
 Clin. Immunol. Immunopathol., 31,
 272-281 (1984)

- (5) BØYUM, A.; Isolation of mononuclear cells and
 granulocytes from human blood
 Scand. Clin. Invest. Suppl. 97, 77
 (1968)

- (6) BONO, M.R. and Direct evidence of homology between
STROMINGER, J.L.; human DC-1 antigen and murine I-A
 molecules
 Nature 299, 276 (1982)

- | | | |
|---------------|---|---|
| (<u>7</u>) | BRODSKY, F.M.,
PARHAM, P.,
BODMER, W.F.; | Monoclonal antibodies to HLA-DRw
Determinants
Tissue Antigens 16, 30-48 (1980) |
| (<u>8</u>) | BRODSKY, F.M.; | A matrix approach to human class II
histocompatibility antigens: reaction
of 4 monoclonal antibodies with the
products of nine haplotypes
Immunogenetics 19, 179 (1984) |
| (<u>9</u>) | BRODSKY, F.M.,
BODMER, W.F.,
PARHAM, P.; | Characterization of a monoclonal
β_2 -microglobulin antibody and its
use in the genetic and biochemical
analysis of MHC antigens
Eur. J. Immunol. 9, 536-545 (1979) |
| (<u>10</u>) | BRODSKY, F.M.,
PARHAM, P.,
BARNSTABLE, C.J.,
CRUMPTON, M.J. and
BODMER, W.F.; | Monoclonal antibodies for analysis
of the HLA system
Immunol. Rev. 47, 3-61 (1979) |
| (<u>11</u>) | CERF-BENSUSSAN, N.,
SCHNEEBERGER, E.E.,
and BHAN, A.K.; | Immunohistologic and immunoelectron
microscopic characterization of the
mucosal lymphocytes of human small
intestine by the use of monoclonal
antibodies
J. Immunol. 130, 2615-2622 (1983) |
| (<u>12</u>) | CHARRON, D.J.
and
Mc DEVITT, H.O.; | Analysis of HLA-D-Region associated
molecules with monoclonal antibody
Proc. nat. Acad. Sci. (Washington,
U.S.A.) 76, 6567 (1979) |

- (13) CHATTOPADHYAY, C., Lack of suppressor cell activity
CHATTOPADHYAY, H., in rheumatoid synovial lymphocytes
NATVIG, J.B., Scand. J. Immunol. 10, 309 (1979)
MICHAELSEN, T.E.
and
MELLBYE, O.J.;
- (14) DAWKINS, R.L., Disease associations with complo-
CHRISTIANSEN, F.T., types, supratypes and haplotypes
KAY, P.H., Immunol. Rev. 70, 1-22 (1983)
GARLEPP, M.,
Mc CLUSKEY, J.,
HOLLINGSWORTH, P.N.,
ZILKO, P.J.;
- (15) DECKER, J.L.; ARA Nomenclature and classification
(Editor) of Arthritis and Rheumatism
Arthr. & Rheumatism, 26 No.8 (1983)
- (16) DEICHER, H., Untersuchungen zur Zusammensetzung
ELLENDORFF, Ch., zirkulierender Immunkomplexe bei
EBRINGER, A. et al.; entzündlichen rheumatischen Krank-
heiten;
Schweizerisch-Deutscher Rheumatologen-
kongreß, 1982
Zeitschrift für Rheumatologie, 41,
Heft 4 (1982)
- (17) DIMITRU-BONA, A., Human mononuclear phagocyte
BURMESTER, G.R., differentiation antigens. 1. Patterns
WATERS, S.J. and of antigenic expression on the sur-
WINCHESTER, R.J.; face of human monocytes and macro-
phages by monoclonal antibodies
J. Immunol. 130, 145-152 (1983)

- (18) DREHER, R.; Experimentelle Immunarthrititis und ihre Bedeutung in der Rheumatherapieforschung und Rheumapathologie Werk-Verlag Dr. E. Banaschewski, München-Gräfelfing (1983)
- (19) DUKE, O.,
PANAYI, G.S.,
JANOSSY, G. and
POULTER, L.W.; An immunohistological analysis of lymphocyte subpopulations and their microenvironment in the synovial membranes of patients with RA using monoclonal antibodies
Clin. Exp. Immunol. 49, 22-30 (1982)
- (20) DUKE, O.,
PANAYI, G.S.,
JANOSSY, G.,
POULTER, L.W. and
TIDMAN, N.; Analysis of T-cell subsets in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis by means of monoclonal antibodies
Annals of the Rheum. Diseases 42, 357-361 (1983)
- (21) ELLIS, S.A.,
TAYLOR, C.,
Mc MICHAEL, A.; Recognition of HLA-B27 and related antigen by a monoclonal antibody
Hum. Immunol. 5, 49-59 (1982)
- (22) FESSEL, J.W.; Rheumatology for Clinicians,
(Editor) Thieme, Stuttgart (1975)
- (23) FØRRE, Ø.,
THOEN, J.,
LEA, T.,
DOBLOUG, J.H.,
MELLBYE, O.J.,
NATVIG, J.B.,
PAHLE, J. and
SOLHEIM, B.G.; In situ Characterization of Mononuclear Cells in Rheumatoid Tissues, Using Monoclonal Antibodies
Scand. J. Immunol. 16, 315-319 (1982)

- (24) FRØLAND, S.S.,
NATVIG, J.B.,
HUSBY, G.;
Immunological characterization of
lymphocytes in Synovial Fluid from
Patients with rheumatoid arthritis
Scand. J. Immunol. 2, 67 (1973)
- (25) GÖTTLINGER, H.G.,
RIEBER, P.,
GOKEL, J.M.,
LOHE, K.J. and
RIETHMÜLLER, G.;
Infiltrating mononuclear cells in
human breast carcinoma: predominance
of T4⁺ monocytic cells in the tumor
stroma
Int. J. Cancer 35, 199-205 (1985)
- (26) HAYNES, B.F.,
HEMLER, M.,
COTNER, T.,
MANN, D. L.,
EISENBARTH, G.S.,
STROMINGER, J.L.
and FAUCI, A.S.;
Characterization of a monoclonal
antibody (5E9) that defines a human
cell surface antigen of cell acti-
vation
J. Immunol. 127, 347-351 (1981)
- (27) HOLZMANN, B. and
JOHNSON, J.;
A beta-galactosidase linked Immuno-
assay for the analysis of antigens
on individual cells
J. Immunol. Methods 60, 359-367
(1983)
- (28) JANOSSY, G.,
DUKE, O.,
POULTER, W.,
PANAYI, G.,
BOFILL, M. and
GOLDSTEIN, G.;
Hypothesis; Rheumatoid Arthritis:
A Disease of T-Lymphocyte/Macrophage
Immunoregulation
The Lancet October, 17, 839 (1981)
- (29) JOHNSON, J.P. and
WANK, R.;
Monoclonal antibodies to polymorphic
epitopes on Ia antigens: three
independent groups of determinants
expressed on DRw6 homozygous cells
Eur. J. Immunol. 14, 739-744 (1984)

- (36) LEMM, G. and
WARNATZ, H.; Enumeration of T cell subsets and functional suppressor cell assays in patients with RA and HLA-B27 associated arthritis
Zeitschrift für Rheumatologie 43, 106-112 (1984)
- (37) LIES, R.B.,
MESSNER, R.P. and
TROUP, G.M.; Histocompatibility antigens and rheumatoid arthritis
Arthr. & Rheumatism 15, 525 (1972)
- (38) LINDBLAD, S. and
HEDFORS, E.; Intraarticular Variation in Synovitis. Local macroscopic and microscopic Signs of Inflammatory Activity are significantly correlated
Arthr. & Rheumatism 28, 977-986 (1985)
- (39) LOHMEYER, J.,
RIEBER, E.P.,
FEUCHT, H.,
JOHNSON, J.,
HADAM, H.,
RIETHMÜLLER, G.; A subset of human natural killer cells isolated and characterized by monoclonal antibodies
Eur. J. Immunol. 11, 997 (1981)
- (40) MARGULIES, D.H.,
KUEHL, W.M.,
SCHARFF, M.D.; Somatic cell hybridization of mouse myeloma cells
Cell 8, 405-415 (1976)
- (41) MASI, A.T. and
MEDSGER, T.A.; Epidemiology of the Rheumatic Diseases, Arthritis and allied conditions
9th edition, ed.D.J.Mc Carty Jr.
p.11. Lea and Febiger, Philadelphia, U.S.A. (1979)

- (42) MATHIES H. et al.; Compendia Rheumatologica I (1982)
- (43) OHTA, N., Association between HLA and
NISHIMURA, Y.K., Japanese patients with Rheumatoid
TANIMOTO, K., Arthritis
HORIUCHI, Y., Hum. Immunol. 5, 123 (1982)
ABE, C.,
SHIOKAWA, Y.,
ABE, T.,
KATAGIRI, M.,
YOSHIKI, T. and
SASAZUKI, T.;
- (44) OLLIER, W., HLA antigen associations with extra-
VENABLES, P.J.W., articular rheumatoid arthritis
MUMFORD, P.A., Tissue Antigens 24, 279-291 (1984)
MAINI, R.N.,
AWAD, J.,
JARAQUEMEDA, D.,
AMARO, J.D. and
FESTENSTEIN, H.;
- (45) OMARY, M.B., Human homologue of murine T 200
TROWBRIDGE, I.S. glycoprotein
and J. Exp. Med. 152, 842-852 (1980)
BATTIFORA, H.A.;
- (46) O'NEILL, G.J., Complement C4 is a marker for adult
NERL, C.W., rheumatoid arthritis (letter)
KAY, P.H., Lancet 1982 Jul. 24; 2, (8291): 214
CHRISTIANSEN, F.T.,
Mc CLUSKEY, J.,
DAWKINS, R.L.;

- (47) PALACIOS, R.,
KEITH, G.,
VAN HEYNINGEN, V.; Monoclonal antibodies against HLA-DR
antigens acting on stimulator cells
prevent OKT 8⁺ T Lymphocytes from
acquiring sensitivity to Interleukin 2
and expressing suppressor function
Eur. J. Immunol. 13, 64-72 (1983)
- (48) PANAYI, G.S. and
WOOLEY, P.H.; B lymphocyte alloantigens in the
study of the genetic basis of
rheumatoid arthritis
Ann. Rheum. Dis. 36, 365 (1977)
- (49) PARHAM, P.; Monoclonal antibodies against two
separate alloantigenic sites of
HLA-B40
Immunogenetics 13, 509-527 (1981)
- (50) PARHAM, P. et al.; Isolation of heavy chain class switch
variants of a monoclonal anti-DC1
hybridoma cell line
Hum. Immunol. 8, 141 (1983)
- (51) RIEBER, P.,
LOHMEYER, J.,
SCHENDEL, D.J.,
GÖTTLINGER, H.,
BRODMANN, S.,
RANK, G.,
HEYDECKE, S.,
KOPP, E. and
RIETHMÜLLER, G.; Characterization of functional human
T cell subsets by monoclonal anti-
bodies.
In: A. Bernard, L. Boumsell, J. Daus-
set, C. Milstein and S.F. Schlossmann
(Editors): Leucocyte typing pp 303-311;
Springer Verlag, Berlin (1984)
- (52) RIEBER, P.,
LOHMEYER, J.,
SCHENDEL, D.J.,
RIETHMÜLLER, G.; Human T cell differentiation antigens
characterizing a cytotoxic/suppressor
T-cell subset
Hybridoma 1, 59 (1981)

- (53) SEIGNALET, J., HLA antigens in rheumatoid arthritis
CLOT, J., Vox Sang 23, 468 (1972)
SANY, J. and
SERRE, H.;
- (54) STASTNY, P.; Association of the B-cell alloanti-
gen DRw4 with rheumatoid arthritis
N. Engl. J. Med. 298, 869 (1978)
- (55) STASTNY, P.; Mixed Lymphocyte culture typing cells
from patients with rheumatoid arthritis
Tissue Antigens 4, 571 (1974)
- (56) STEEL, C.M.; Human MHC class II antigens: genetics,
(Editor) structure and function
Disease Markers 2 (1984)
- (57) STEIN, H., Identification of Hodgkin and
GERDES, J., Sternberg-Reed cells as a unique
SCHWAB, U., cell type derived from a newly-
LEMKE, H., detected small-cell population
MASON, D.J., Int. J. Cancer 30, 445-459 (1982)
ZIEGLER, A.,
SCHIENLE, W.,
DIEHL, V.;
- (58) UGOLINI, V., Initial characterization of monoclonal
NUNEZ, G., antibodies against human monocytes
SMITH, R.G., Proc. nat. Acad. Sci. (Washington,
STASTNY, P. and U.S.A.) 77, 6764-6768 (1980)
CAPRA, J.D.;

- (59) WAALLEN, K.,
THOEN, J.,
FØRRE, Ø.,
HOVIG, T.,
TEIGLAND, J.,
NATVIG, J.B.; Rheumatoid Synovial Dendritic Cells
as Stimulators in Allogeneic and
Autologous Mixed Leucocyte Reactions
- Comparison with Autologous Monocytes
as Stimulator Cells
Scand. J. Immunol. 23, 233-241 (1986)
- (60) WERNET, P.,
ZIEGLER, A.,
SHAW, S.,
BLAUROCK, M.
and
PAWELEC, G.; Monoclonal antibodies against Ia-like
antigens inhibiting HLA-D and/or SB -
directed secondary lymphoproliferative
responses
Transplant. Proc. 15, 94 (1983)
- (61) WOOD, G.S.,
WARNER, N.L. and
WARNKE, R.A.; Anti-Leu 3/T4 antibodies react with
cells of monocyte/macrophage and
Langerhans lineage
J. Immunol. 131, 212-216 (1983)
- (62) YOUNG, A.,
JARAQUEMEDA, D.,
AWAD, J.,
FESTENSTEIN, H.,
CORBETT, M.,
HAY, F.C. and
ROITT, I.M.; Association of HLA-DR 4/Dw 4 and
DR2/Dw2 with radiologic changes in a
prospective study of patients with
rheumatoid arthritis
Arthr. & Rheumatism 26, 511 (1983)
- (63) YOUNG, C.L.,
ADAMSON, T.C. III,
VAUGHAN, J.H. and
FOX, R.J. Immunohistologic characterization of
synovial membrane lymphocytes in
rheumatoid arthritis
Arthr. & Rheumatism 27, 32 (1984)

An dieser Stelle möchte ich all Jenen danken,
die diese Arbeit möglich gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Professor Dr. G. RIETHMÜLLER, meinem
Doktorvater, für die Überlassung des Themas
und die persönliche Betreuung.
- Herrn Professor Dr. M. JÄGER (+).
Seine Hilfsbereitschaft bleibt mir unvergessen.
- Herrn Privatdozent Dr. F.-W. HAGENA und Herrn
Dr. J. M. SCHMIDT für die Betreuung des klini-
schen Teils der Arbeit.
- Frau Dr. J. JOHNSON und Frau J. DÖHRMANN für
hilfreiche Diskussionen und selbstlose Unter-
stützung.
- Frau Ch. JUNG für ihre Hilfe bei der mikro-
skopischen Beurteilung der Präparate.
- Dem Institut für Immunologie und den ortho-
pädischen Kliniken Harlaching und Großhadern.
- Meinen Eltern.

Lebenslauf:

Adresse:

Christian SCHALLER
Lilienstr. 3
8034 Germering

Persönliche Daten:

Geburtsdatum	6.9.1961	München
Vater		Ernst SCHALLER, geb. 1.3.1920 Vorsitzender Richter am Oberlandesgericht i.R.
Mutter		Maria SCHALLER, geb. Horneber, 29.12.1926 Juristin
Staatsangehörigkeit		deutsch
Konfession		römisch - katholisch
Familienstand		ledig

Ausbildungsdaten:

Grundschule	1967-1971	in Germering
Abitur	Juni 1980	Notendurchschnitt 1,8
Studium der Physik	Okt. 1980 -Okt. 1981	an den Universitäten München und Köln
Studium der Humanmedizin	Okt. 1981 -Apr. 1987	an der Ludwig- Maximilians - Universität München, mit Praktischem Jahr in Orthopädie, Orthopädische Klinik München - Harlaching Innere Medizin, Med. Poliklinik der Universität Chirurgie, KKH Starnberg

Approbation

18.5.1987

